

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

Kakimoto et al  
Filed 8/1/01  
Q65478  
10f1

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2001年 3月15日

出願番号  
Application Number:

特願2001-073812

出願人  
Applicant(s):

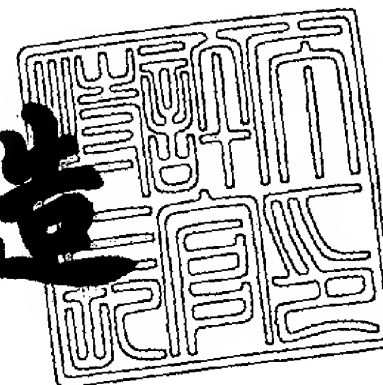
住友化学工業株式会社

J1050 U.S. PTO  
09/918508  
08/01/01

2001年 7月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3063049

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P152622  
【提出日】 平成13年 3月15日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A01H 5/00  
C07K 14/72  
C12N 1/15  
C12N 1/21

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市西緑丘2丁目2番2-223号

【氏名】 柿本 辰男

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市青江4丁目11番9号

【氏名】 樋口 雅之

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区天満3丁目1番17号

【氏名】 井上 努

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-6220-3405  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100113000  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中山 亨  
【電話番号】 06-6220-3405  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 010238  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9903380  
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サイトカイン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用  
またはアンタゴニスト作用の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記（ア）～（ク）のいずれかのサイトカイン受容体をコードする DNA を  
宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞と被験物質とを接触させることを特徴  
とする、該サイトカイン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアン  
タゴニスト作用の測定方法。

（ア）配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するサイトカイン受容体

（イ）配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有するサイトカイン受容体

（ウ）膜貫通領域が欠失されてなり、天然型サイトカイン受容体よりも膜貫通  
領域の個数が少ない変異型サイトカイン受容体

（エ）配列番号 1 のアミノ酸番号 1 9 6 から 1 1 7 6 で示されるアミノ酸配列か  
らなるサイトカイン受容体

（オ）配列番号 1 のアミノ酸番号 5 0 から 1 1 7 6 で示されるアミノ酸配列か  
らなるサイトカイン受容体

（カ）配列番号 3 のアミノ酸番号 3 2 から 1 0 3 6 で示されるアミノ酸配列か  
らなるサイトカイン受容体

（キ）サイトカイン受容体の細胞外領域、サイトカイン受容体の膜貫通領域  
、サイトカイン受容体のヒスチジンキナーゼ領域および微生物由来のヒスチジ  
ンキナーゼのレシーバー領域から構成されるキメラ受容体

（ク）上記（ア）、（イ）、（エ）、（オ）または（カ）のアミノ酸配列におい  
て 1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有  
するサイトカイン受容体

【請求項 2】

宿主細胞が出芽酵母である請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 3】

宿主細胞が植物細胞である請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 4】

宿主細胞が、ひとつ以上のヒスチジンキナーゼの機能を実質的に欠失させた出芽酵母もしくは植物細胞である請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 5】

ヒスチジンキナーゼが、Sln1遺伝子にコードされているヒスチジンキナーゼである請求項 4 に記載の測定方法。

【請求項 6】

宿主細胞が、ひとつ以上のヒスチジンキナーゼの機能を実質的に欠失させかつ PTP2 Tyrosine phosphatase遺伝子を導入し発現させた出芽酵母である請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 7】

下記（ケ）～（セ）のいずれかのサイトカイニン受容体。

（ケ）膜貫通領域が欠失されてなり、天然型サイトカイニン受容体よりも膜貫通領域の個数が少ない変異型サイトカイニン受容体

（コ）配列番号 1 のアミノ酸番号 1 9 6 から 1 1 7 6 で示されるアミノ酸配列からなるサイトカイニン受容体

（サ）配列番号 1 のアミノ酸番号 5 0 から 1 1 7 6 で示されるアミノ酸配列からなるサイトカイニン受容体

（シ）配列番号 3 のアミノ酸番号 3 2 から 1 0 3 6 で示されるアミノ酸配列からなるサイトカイニン受容体

（ス）サイトカイニン受容体の細胞外領域、サイトカイニン受容体の膜貫通領域、サイトカイニン受容体のヒスチジンキナーゼ領域および微生物由来のヒスチジンキナーゼのレシーバー領域から構成されるキメラ受容体

（セ）上記（コ）、（サ）または（シ）のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するサイトカイニン受容体

【請求項 8】

請求項 7 に記載のサイトカイニン受容体をコードする DNA。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の DNA を宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞。

【請求項 1 0】

請求項 1 に記載の形質転換細胞を被験物質を含む培地で培養する工程を含むことを特徴とする、サイトカイニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定方法。

【請求項 1 1】

被験物質を含む培地が、1 nM 以上 1 mM 以下の濃度で被験物質を含む培地である請求項 1 0 に記載の測定方法。

【請求項 1 2】

請求項 1、2、3、4、5、6、1 0 または 1 1 に記載の方法によって、サイトカイニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用を測定することを特徴とする、サイトカイニン受容体に対するアゴニストまたはサイトカイニン受容体に対するアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載のスクリーニング方法によって選抜されるサイトカイニン受容体に対するアゴニストまたはサイトカイニン受容体に対するアンタゴニストを有効成分とする植物生育調節剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サイトカイニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定方法やサイトカイニン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法等に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

サイトカイニンは、高等植物の細胞分裂と分化に関する植物ホルモンであり、(1) 高等植物細胞の分裂の誘起、(2) カルスや髄から茎葉への分化、(3) 葉の黄化や落葉、落果等の防止、(4) 頂芽優先の打破、等の作用を示すことが知られている重要な生理活性物質である [Cytokinins: Chemistry, Activity, a

nd Function, CRC Press (1994)]。サイトカニン様の作用を有する物質は、植物成長調節剤、例えば、果樹であるリンゴ、ミカンなどの落果防止剤、植物の草丈を調節することによるイネ、ムギなどの倒伏防止剤、収穫後の果実の甘味増強剤などとして利用可能である。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】

これまで一般に、サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定には、被験物質を直接植物個体に散布してその生理的な変化を観察する方法が用いられてきた。該方法においては、植物個体に散布するに足る量の被験物質を準備することを必要とし、また前記植物個体の育成や被験物質散布後の植物個体の生理的変化の観察に多大な時間と労力を要する、といった問題があった。そこで、少量の被験物質で、鋭敏で、簡便、迅速に、サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用を測定する方法の開発が求められていた。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる状況のもと鋭意検討をした結果、サイトカニン受容体として機能するタンパク質を見出し、該サイトカニン受容体を利用することによってサイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用を測定することが可能であることを見出して、本発明に至った。

【 0 0 0 5 】

すなわち、本発明は、

(1) 下記 (ア) ~ (ク) のいずれかのサイトカニン受容体をコードする DNA を宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞と被験物質とを接触させることを特徴とする、該サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定方法、

(ア) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するサイトカニン受容体

(イ) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有するサイトカニン受容体

(ウ) 膜貫通領域が欠失されてなり、天然型サイトカニン受容体よりも膜貫通

領域の個数が少ない変異型サイトカニン受容体

(エ) 配列番号1のアミノ酸番号196から1176で示されるアミノ酸配列からなるサイトカニン受容体

(オ) 配列番号1のアミノ酸番号50から1176で示されるアミノ酸配列からなるサイトカニン受容体

(カ) 配列番号3のアミノ酸番号32から1036で示されるアミノ酸配列からなるサイトカニン受容体

(キ) サイトカニン受容体の細胞外領域、サイトカニン受容体の膜貫通領域、サイトカニン受容体のヒスチジンキナーゼ領域および微生物由来のヒスチジンキナーゼのレシーバー領域から構成されるキメラ受容体

(ク) 上記(ア)、(イ)、(エ)、(オ)または(カ)のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するサイトカニン受容体

(2) 宿主細胞が出芽酵母である前項1に記載の測定方法、

(3) 宿主細胞が植物細胞である前項1に記載の測定方法、

(4) 宿主細胞が、ひとつ以上のヒスチジンキナーゼの機能を実質的に欠失させた出芽酵母もしくは植物細胞である前項1に記載の測定方法、

(5) ヒスチジンキナーゼが、Sln1遺伝子にコードされているヒスチジンキナーゼである前項4に記載の測定方法、

(6) 宿主細胞が、ひとつ以上のヒスチジンキナーゼの機能を実質的に欠失させかつPTP2 Tyrosine phosphatase遺伝子を導入し発現させた出芽酵母である前項1に記載の測定方法、

(7) 下記(ケ)～(セ)のいずれかのサイトカニン受容体、

(ケ) 膜貫通領域が欠失されてなり、天然型サイトカニン受容体よりも膜貫通領域の個数が少ない変異型サイトカニン受容体

(コ) 配列番号1のアミノ酸番号196から1176で示されるアミノ酸配列からなるサイトカニン受容体

(サ) 配列番号1のアミノ酸番号50から1176で示されるアミノ酸配列からなるサイトカニン受容体



(シ) 配列番号 3 のアミノ酸番号 3 2 から 1 0 3 6 で示されるアミノ酸配列からなるサイトカイニン受容体

(ス) サイトカイニン受容体の細胞外領域、サイトカイニン受容体の膜貫通領域、サイトカイニン受容体のヒスチジンキナーゼ領域および微生物由来のヒスチジンキナーゼのレシーバー領域から構成されるキメラ受容体

(セ) 上記 (コ)、(サ) または (シ) のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するサイトカイニン受容体

(8) 前項 7 に記載のサイトカイニン受容体をコードする DNA、

(9) 前項 8 に記載の DNA を宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞、

(10) 前項 1 に記載の形質転換細胞を被験物質を含む培地で培養する工程を含むことを特徴とする、サイトカイニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定方法、

(11) 被験物質を含む培地が、1 nM 以上 1 mM 以下の濃度で被験物質を含む培地である前項 10 に記載の測定方法、

(12) 前項 1、2、3、4、5、6、10 または 11 に記載の方法によって、サイトカイニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用を測定することを特徴とする、サイトカイニン受容体に対するアゴニストまたはサイトカイニン受容体に対するアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(13) 前項 12 に記載のスクリーニング方法によって選抜されるサイトカイニン受容体に対するアゴニストまたはサイトカイニン受容体に対するアンタゴニストを有効成分とする植物生育調節剤を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下、詳細に本発明を説明する。

サイトカイニン受容体は、サイトカイニンに特異的に結合し、Two-Component regulatory system (または His to Asp phosphorelay system) と呼ばれる細胞

内情報伝達メカニズムによって高等植物細胞の増殖、分化を制御する機能を有するタンパク質である。サイトカイニン受容体は、ヒスチジンキナーゼファミリーに属しており、細胞外領域、膜貫通領域、細胞内でヒスチジンキナーゼ活性を有しHis残基を保持するヒスチジンキナーゼ領域およびリン酸基転移の受容部位であるAsp残基を保持するレシーバー領域構成されている。本発明方法に使用されるサイトカイニン受容体としては、配列番号1または3で示されるアミノ酸配列を有するサイトカイニン受容体、配列番号1または3で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するサイトカイニン受容体（以下、これらをまとめて本受容体と記す。）、後述する変異型サイトカイニン受容体、後述するキメラ受容体等を挙げることができる。サイトカイニンとしては例えば、カイネチン、ゼアチン等のプリン系サイトカイニン、N-フェニル-N'-(4-ピリジル)ウレア等のウレア系サイトカイニンを挙げることができる。ここで、「複数のアミノ酸」とは、2個～二十個程度のアミノ酸を意味し、例えば2個～十数個のアミノ酸、2個～数個のアミノ酸を意味する。

## 【 0 0 0 7 】

（本受容体をコードするDNAを導入・発現させた形質転換細胞の作製）

本受容体をコードするDNAを宿主細胞に導入・発現させた形質転換細胞は、本受容体をコードするDNA、例えば、配列番号1または3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA等、さらに具体的には配列番号2または4で示される塩基配列を有するDNA等を、以下のようにして宿主細胞に導入・発現させることにより得ることができる。以下、該形質転換細胞の作製方法についてその一例を示す。

## 【 0 0 0 8 】

## （1）cDNAの調製

まず、例えばJ., Sambrook, E., F., Frisch, T., Maniatis著、モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）記載の方法に準じて、植物から、全RNAを調製する。高等植物とは、例えば、イネ、トウモロコシ、ムギ等の単子葉植物、タバコ、ダイズ、アラビドプシス等の双子葉植物等をあげるこ

とができる。高等植物の組織の一部を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などにより物理的に磨砕し、これに塩酸グアニジンとフェノールとを含む溶液をもしくは SDS とフェノールとを含む溶液を添加して全 RNA を得る方法、前述の磨砕物にグアニジンチオシアネートを含む溶液を添加して、さらに CsCl を加え遠心分離することにより全 RNA を得る方法等を用いればよい。該全 RNA 調製には、例えば ISOGEN (ニッポンジーン社製)、RNeasy Total RNA Purification Kit (QIAGEN 社製) などの市販のキットを用いることもできる。次いで、全 RNA から mRNA を調製する。例えば、セルロースまたはラテックスに結合されたオリゴdT鎖と mRNA のポリA鎖とのハイブリダイゼーションを利用した方法等を用いることができる。該 mRNA 調製には mRNA Purification Kit (アマシャムファルマシア社製)、Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 <Super> (宝酒造社製) の市販のキットを用いることができる。さらに、このようにして精製されたポリA鎖をもつ mRNA を用いて cDNA を作製する。cDNA は、例えば、オリゴdT鎖、またはランダムプライマーを mRNA にアニールさせた後に、逆転写酵素を作用させることにより作製することができる。またさらに、例えば RNaseH、DNA Polymerase I を作用させることにより、2本鎖 cDNA を作製することができる。該操作には SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit (クロンテック社製)、cDNA Synthesis Kit (宝酒造社製)、cDNA Synthesis Kit (アマシャムファルマシア社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) 等を用いることができる。

#### 【 0 0 0 9 】

##### (2) クローニング

前記 cDNA から、例えば、配列番号 2 または 4 で示される塩基配列の部分塩基配列を有する DNA をプライマーとして用いるポリメラーゼチェーン反応 (以下、PCR と記す。) や、配列番号 2 または 4 で示される塩基配列の部分塩基配列を有する DNA をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法により、本受容体をコードする DNA を取得することができる。

#### 【 0 0 1 0 】

PCR を用いる場合、約 20bp から約 40bp 程度の塩基配列、例えば配列番号 2 または 4 で示される塩基配列の 5' 非翻訳領域および 3' 非翻訳領域からそれぞれ

選択した塩基配列に基いて設計、合成したDNAをプライマーのセットとして用いることができ、例えば、配列番号9で示される塩基配列からなるDNAと配列番号10で示される塩基配列からなるDNAとのセットをプライマーのセットとして挙げるができる。PCR反応液はライブラリー250ngにキット指定の反応液を添加して調製する。反応条件は使用するプライマーセットによって変えることができるが、例えば、94℃で2分間保温し、その後約8℃で3分間保温した後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で4分間のサイクルを40サイクル程度繰り返す条件や、94℃で5秒間次いで72℃で4分間の保温を1サイクルとしてこれを5から10サイクル行い、さらに、94℃で5秒間次いで70℃で4分間の保温を1サイクルとしてこれを20から40サイクル程度行う条件を使用することができる。かかるPCRには、例えばTakara Heraculase<sup>TM</sup>（宝酒造社製）、Advantage cDNA PCR Kit（クロンテック社製）に含まれるDNAポリメラーゼ、TAKARA Ex Taq（宝酒造社製）、PLATINUM<sup>TM</sup> PCR SUPER Mix（ライフテックオリエンタル社製）等を用いることができる。

#### 【 0 0 1 1 】

ハイブリダイゼーション法を用いる場合、例えばクローニングとシーケンス：植物バイオテクノロジー実験マニュアル（渡辺、杉浦編集、農村文化社1989年）記載の方法に準じて行うことができる。

例えば、配列番号2または4で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNA（約10塩基～約50塩基程度の鎖長）を合成し、該DNAを例えばRandom Primed DNA Labelling Kit（ベーリンガー社製）、Random Primer DNA Labelling Kit Ver.2（宝酒造社製）、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System（アマシャムファルマシア社製）、Megaprime DNA-labelling system（アマシャムファルマシア社製）等を用いた公知の方法によってラジオアイソトープ標識または蛍光標識することによって、これをプローブとして使用することができる。

ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、ストリンジェントな条件をあげることができ、具体的には例えば、6×SSC（0.9M NaCl、0.09Mクエン酸ナトリウム）、5×デンハルト溶液（0.1%(w/v) フィコール400、0.1%(w/v) ポリビニ

ルピロリドン、0.1%BSA)、0.5%(w/v) SDS及び100  $\mu$ g/ml変性サケ精子DNA存在下に、または100  $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液(ペーリンガー・マンハイム社)中で、65℃で保温し、次いで1×SSC(0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム)および0.5%SDS存在下に、室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC(0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸ナトリウム)および0.5%SDS存在下に、68℃で30分間保温する条件をあげることができる。

例えば、シロイヌナズナのサイトカニン受容体DNAを得るためには、シロイヌナズナcDNAライブラリーファージ液(約1000000pfu)を鋳型に、TAKARA LA taq<sup>TM</sup>(宝酒造社製)を用いて配列番号11に示すDNAと配列番号12に示すDNAをプライマーとしてPCRを行いプローブとするDNAを増幅することが出来る。PCR反応液はDNAライブラリー250ngにキット指定の反応液を添加して調製する。PCRの条件は、94℃で2分間保温し、その後8℃で3分間保温した後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、68℃で5分間のサイクルを40サイクル繰り返すことにより増幅を行うことが出来る。次に増幅されたDNAを鋳型にしてMegaprime DNA-labelling system(アマシャムファルマシア社製)を用いてキット指定の反応液を用いることにより<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブを作成することが出来る。このプローブを用いて定法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行い、6×SSC(0.9M NaCl、0.09Mクエン酸ナトリウム)、5×デンハルト溶液(0.1%(w/v) フィコール400、0.1%(w/v) ポリビニルピロリドン、0.1%BSA)、0.5%(w/v) SDS及び100  $\mu$ g/ml変性サケ精子DNA存在下に、または100  $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液(ペーリンガー・マンハイム社)中で、65℃で保温し、次いで1×SSC(0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム)および0.5%SDS存在下に、室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC(0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸ナトリウム)および0.5%SDS存在下に、68℃で30分間保温することでハイブリダイズするクローンを得ることが出来る。

#### 【 0 0 1 2 】

また、本受容体をコードするDNAは、例えば配列番号2または4で示される塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984)等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行

うことにより調製することもできる。

【 0 0 1 3 】

上記のようにして得られた本受容体をコードするDNAは、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてベクターにクローニングすることができる。用いるベクターとしては例えば、pBlueScriptIIベクター (Stratagene社製)、pUC18/19ベクター (宝酒造社製)、TAクローニングベクター (Invitrogen社製) 等が挙げられる。

【 0 0 1 4 】

なお、クローニングされた前記DNAの塩基配列は、Maxam Gilbert法 (例えば、Maxam, A.M & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977 等に記載される) や Sanger法 (例えば Sanger, F. & A.R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975、Sanger, F, & Nicklen and A.R. Coulson., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977等に記載される) により確認することができる。この際、例えば市販のTermo Sequenase II dye terminator cycle sequencing kit (アマシャムファルマシア社製)、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズジャパン社製) 等を用いることができる。

【 0 0 1 5 】

(3) 発現ベクターの構築

本受容体をコードするDNAの発現ベクターは、通常の方法 (例えば、J., Sambrook, E., F., Frisch, T., Maniatis 著、モレキュラークローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー 発行 (Cold Spring Harbor Laboratory press) 等に記載されている方法) に準じて行うことができる。

例えば、形質転換する宿主細胞において利用可能なベクター、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるベクターであって、さらに、宿主細胞からの単離・精製が可能であり、検出可能なマーカーを持っていたりも良いベクター (具体的には、大腸菌等の細菌を宿主細胞とする場合には、例え



ばプラスミドpUC119(宝酒造(株)製)や、ファージミドpBluescriptII(ストラタジーン社製)等。酵母を宿主細胞とする場合は、例えばプラスミドpACT2(Clontech社製)等。植物細胞を宿主細胞とする場合は、例えばpBI221(Clontech社)等。)に、本受容体をコードするDNAを組み込むことにより構築することができる。

本受容体をコードするDNAの上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合する形で前記ベクターに組み込むことにより、本受容体をコードするDNAを宿主細胞で発現させることの可能な発現ベクターを構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本受容体をコードするDNAが導入される宿主細胞においてプロモーターの制御下に本受容体をコードするDNAが発現するように、該プロモーターと本受容体をコードするDNAとを結合させることを意味する。宿主細胞で機能可能なプロモーターとしては、例えば、宿主細胞が大腸菌である場合には、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター(lacP)、トリプトファンオペロンのプロモーター(trpP)、アルギニンオペロンのプロモーター(argP)、ガラクトースオペロンのプロモーター(galP)、tacプロモーター、T7プロモーター、T3プロモーター、λファージのプロモーター(λ-pL、λ-pR)等をあげることができる。また、宿主細胞が酵母である場合にはADH1プロモーターなどをあげることができる。宿主細胞が植物細胞である場合には、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCT)プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来19Sプロモーター、CaMV由来35Sプロモーター等をあげることができる。

また、本受容体をコードするDNAを、宿主細胞において機能可能なプロモーターをあらかじめ保有するベクターに組み込む場合には、該ベクター保有のプロモーターと本受容体をコードするDNAとが機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本受容体をコードするDNAを挿入すればよい。例えば、前述の酵母用プラスミドpACT2はADH1プロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体のADH1プロモーターの下流に本受容体をコードするDNAを挿入すれば、本受容体をコードするDNAを例えばCG1945(Clontech社製)等の酵母内で発現させることが可能な発現ベクターが構築できる。

## 【 0 0 1 6 】

## (4) 形質転換細胞の作製

構築された発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明方法に用いる形質転換細胞を取得することができる。形質転換される宿主細胞としては、例えば、細菌、酵母、植物細胞等を挙げることができる。細菌としては、例えば大腸菌、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属等に属する細菌を挙げることができ、酵母としては、出芽酵母、分裂酵母を挙げることができ、具体的には例えばサッカロマイセス属、スキゾサッカロマイセス属等に属する酵母を挙げることができ、植物細胞としては、例えばタバコの培養細胞であるBY-2 株、トウモロコシ (Black Mexican Sweet) の培養細胞であるBMS 株等を挙げることができる。

前記発現ベクターを該宿主細胞へ導入する方法としては、形質転換される宿主細胞に応じた通常の導入方法を適用することができる。例えば、細菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J.Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー、1989年)等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等の通常の方法を用いることにより前記発現ベクターを宿主細胞へ導入することができる。酵母を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法を基にしたYeast transformation kit(Clontech社製)等を用いて導入することができる。また、植物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917及び特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887及び特開平5-68575)、パーティクルガン方法(特表平5-508316及び特開昭63-258525)等の一般的なDNA導入法により宿主細胞に該発現ベクターを導入することができる。

## 【 0 0 1 7 】

## (膜貫通回数変異型受容体を発現させた形質転換体)

本発明に用いられるサイトカイニン受容体としては、膜貫通領域が欠失されており、天然型サイトカイニン受容体(膜貫通領域が2個～4個程度)よりも膜貫通領域の個数が少ない変異型サイトカイニン受容体を挙げることにもできる。

サイトカイニン受容体、例えば配列番号1または3に示されるアミノ酸配列、



配列番号1または3で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列について、例えば [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) に記載される構造予測ソフトウェアを用いてサイトカイニン受容体の膜貫通領域の構造を推定し、推定された膜貫通領域の一部分、例えば膜貫通領域1個～2個程度を欠失させてなり、天然型より膜貫通領域の個数が少ない変異型サイトカイニン受容体を挙げるることができる。具体的には、配列番号1のアミノ酸番号196～1176で示されるアミノ酸配列からなる変異型サイトカイニン受容体（膜貫通領域2個）、配列番号1のアミノ酸番号50～1176で示されるアミノ酸配列からなる変異型サイトカイニン受容体（膜貫通領域3個）、配列番号3のアミノ酸番号32～1036で示されるアミノ酸配列からなる変異型サイトカイニン受容体（膜貫通領域2個）、これらのアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる変異型サイトカイニン受容体、例えばこれらのアミノ酸配列のアミノ末端に1つのメチオニンが付加されたアミノ酸配列からなる変異型サイトカイニン受容体等を挙げるることができる。

#### 【0018】

該変異型サイトカイニン受容体をコードするDNAを宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞は、以下のようにして作製した該変異型サイトカイニン受容体をコードするDNAを、前記した通常の遺伝子工学的手法を用いて発現ベクターに組み込んで該発現ベクターを前述の宿主細胞に導入することにより取得することができる。

#### 【0019】

該変異型サイトカイニン受容体をコードするDNAは、通常の遺伝子工学的手法を用いることによって作製することができる。例えばPCRによって作製する場合、まず、増幅しようとする変異型サイトカイニン受容体をコードするDNAの5'端領域の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（5'側プライマー）および3'端領域の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（3'側プライマー）をそれぞれ設計、合成する。該プライマーとしては、通常14塩基程度以上35塩基程度以下のオリゴヌクレオチドであればよく、さらにこのプライマーの5'

末端側には、PCRによって増幅されたポリヌクレオチドとベクターとの連結の際に利用しうる制限酵素認識配列を設けておくことが好ましい。次いで、高等植物のcDNAライブラリーを鋳型として通常PCRに使用する反応条件を用いて増幅反応を行えばよい。例えば、シロイヌナズナのcDNAライブラリーを鋳型として、配列番号21に示すDNAおよび配列番号22に示すDNAをプライマーとしてPCR反応を行えば、配列番号1のアミノ酸番号196～1176で示されるアミノ酸配列のN末端にメチオニンを付加したアミノ酸配列からなる変異型サイトカイニン受容体コードするDNAを増幅することができる。

該変異型サイトカイニン受容体をコードするDNAとしては、例えば、配列番号1のアミノ酸番号196～1176で示されるアミノ酸配列、配列番号1のアミノ酸番号50～1176で示されるアミノ酸配列、配列番号3のアミノ酸番号32～1036で示されるアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列等をコードする塩基配列からなるDNAを挙げることができる。具体的には、配列番号2の塩基番号586～3531で示される塩基配列、配列番号2の塩基番号148～3531で示される塩基配列、配列番号4の塩基番号94～3174で示される塩基配列、またはこれらの塩基配列と80%以上好ましくは90%以上のホモロジーを有する塩基配列からなるDNAを挙げることができる。

#### 【0020】

(キメラ受容体を発現させた形質転換体)

本発明方法に使用するサイトカイニン受容体としては、サイトカイニン受容体の細胞外領域、サイトカイニン受容体の膜貫通領域、サイトカイニン受容体のヒスチジンキナーゼ領域、および微生物由来ヒスチジンキナーゼのレシーバー領域から構成されるキメラ受容体を挙げることにもできる。ヒスチジンキナーゼは高等植物、微生物に共通して次のような配列を有する。即ち、細胞外領域、膜貫通領域(通常2個～4個)、細胞内でヒスチジンキナーゼ活性を有しHis残基を保持するヒスチジンキナーゼ領域およびリン酸基転移の受容部位であるAsp残基を保持するレシーバー領域からなる。該キメラ受容体の細胞外領域、膜貫通領域およびヒスチジンキナーゼ領域としてその細胞外領域、膜貫通領域およびヒスチジン

キナーゼ領域を使用するサイトカニン受容体としては、前記本サイトカニン受容体や配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を有するサイトカニン受容体等を挙げることができる。該キメラ受容体のレシーバー領域としてはサイトカニン受容体のレシーバー領域を機能的に相補できるものであれば良く、そのレシーバー領域を使用する微生物由来ヒスチジンキナーゼとしては、例えば酵母、大腸菌等の微生物由来ヒスチジンキナーゼ、さらに具体的には、出芽酵母由来の Sln1 遺伝子にコードされるヒスチジンキナーゼ、サルモネラ由来の Chey 遺伝子にコードされるヒスチジンキナーゼ、大腸菌のハイブリッドセンサーである RcsC 遺伝子にコードされるヒスチジンキナーゼ (Maeda T et al. Nature:369 242-245(1994))、分裂酵母の細胞周期制御にかかわる Phks 遺伝子にコードされるヒスチジンキナーゼ (Shieh, JC et al, Gene Dev. 11, 1008-1022 (1997)) 等を挙げることができる。

#### 【 0 0 2 1 】

該キメラ受容体をコードする DNA を宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞は、以下のようにして作製した該キメラ受容体をコードする DNA を、前記した通常の遺伝子工学的手法を用いて発現ベクターに組み込んで、該発現ベクターを前述の宿主細胞に導入することにより取得することができる。

キメラ受容体をコードする DNA は、サイトカニン受容体の細胞外領域、サイトカニン受容体の膜貫通領域、サイトカニン受容体のヒスチジンキナーゼ領域および微生物由来ヒスチジンキナーゼのレシーバー領域の各領域をコードする DNA をそれぞれ作製し、これらを途中で終止コドンが現れないように、かつ適当なリンカーを用いてフレームがずれないように通常の遺伝子工学的手法を用いて接続することによって構築することができる。なお、サイトカニン受容体の細胞外領域およびサイトカニン受容体の膜貫通領域をコードする DNA や、サイトカニン受容体の細胞外領域、サイトカニン受容体の膜貫通領域およびサイトカニン受容体のヒスチジンキナーゼ領域はひとつの DNA として作製することもできる。

#### 【 0 0 2 2 】

前記各領域をコードするポリヌクレオチドは、公知の方法を用いてそれぞれ作

製すればよい。例えばPCRによって作製する場合、まず、増幅しようとする各領域の5' 端領域の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（5' 側プライマー）および3' 端領域の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（3' 側プライマー）をそれぞれ設計、合成する。該プライマーとしては、通常14塩基程度以上35塩基程度以下のオリゴヌクレオチドであればよく、さらにこのプライマーの5' 末端側には、PCRによって増幅されたポリヌクレオチドどうしの連結またはこれらポリヌクレオチドとベクターとの連結の際に利用しうる制限酵素認識配列を設けておくことが好ましい。次いで、cDNAライブラリーを鋳型として通常PCRに使用する反応条件を用いて増幅反応を行えばよい。使用する鋳型は、サイトカニン受容体の膜貫通領域を介した細胞外領域もしくはサイトカニン受容体のヒスチジンキナーゼ領域をコードするポリヌクレオチドの調製の場合は、前記の高等植物由来のcDNAのライブラリーを、微生物由来ヒスチジンキナーゼのレシーバー領域をコードするポリヌクレオチドの調製の場合は、通常の方法で調製された該微生物のcDNAライブラリーもしくは全DNAを使用することができる。

#### 【0023】

該キメラ受容体としてさらに具体的には、例えば、配列番号1、3または5に示すアミノ酸配列を有するサイトカニン受容体のレシーバー領域を、例えば配列番号7に示すアミノ酸配列を有する出芽酵母由来のSln1遺伝子にコードされるヒスチジンキナーゼのレシーバー領域や配列番号8に示すアミノ酸配列を有する大腸菌のハイブリッドセンサーであるRcsC遺伝子にコードされるヒスチジンキナーゼのレシーバー領域などに置き換えたキメラ受容体を挙げることができる。

#### 【0024】

（サイトカニンに関わる細胞内情報伝達系）

本発明方法においては、サイトカニン受容体とサイトカニンとが結合することによって発せられるシグナルを細胞内に伝達するために、使用する前述の宿主細胞が本来有している細胞内情報伝達系を利用することができる。また、該宿主細胞に、Two-Component regulatory systemと呼ばれる細胞内情報伝達機能を担うレギュレーターおよび／またはメディエーターをコードするDNAを導入・

発現させ、これを細胞内情報伝達系として利用することもできる。利用可能なTwo-Component regulatory systemとしては、例えば、シロイヌナズナにおいては5種類の受容体 ETR1、ETR2、ERS1、ERS2およびEIN4 (Chang et al. Science 262:539-544(1993)、Hua et al. Science 269:1712-1714(1995)、Sakai et al. Plant Cell Physiol 39:1232-1239 (1998) ) や浸透圧のセンサー機能を有するAtH K1 (Urao Plant Cell 11:1743-1754 (1999) ) に対応したTwo-Component regulatory systemを挙げることができる。

## 【 0 0 2 5 】

また、前述の宿主細胞が有するヒスチジンキナーゼ構造を有するタンパク質を欠損させ、これをサイトカイニン受容体を導入するための宿主細胞として使用することもできる。例えば、Saccharomyces cerevisiae等の出芽酵母由来の浸透圧センサー機能を有するタンパク質をコードするSln1遺伝子を欠損させた株 (Maeda et al. Nature:369 242-245(1994)) を挙げることができる。この株はSaccharomyces cerevisiae に存在する唯一のヒスチジンキナーゼ構造を有するタンパク質を欠損しているために、サイトカイニン受容体からのシグナルを明確に検出できる点で、本発明方法に好ましく使用できる。また、大腸菌のハイブリッドセンサーであるRcsC遺伝子の欠損株や分裂酵母の細胞周期制御にかかわるPhks遺伝子欠損株などを使用することもできる。

## 【 0 0 2 6 】

(本発明方法；該サイトカイニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定方法)

本発明方法においては、本受容体をコードするDNAを宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞、前記変異型サイトカイニン受容体をコードするDNAを宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞または前記キメラ受容体をコードするDNAを宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞(以下、これらをまとめて、本形質転換体と記す。)のいずれかを、被験物質を含む培地で培養すればよい。本形質転換体の培養は、液体培地中にて培養する液体培養や、前記液体培地に寒天等を加えた固体培地上にて培養する固体培養等いずれの形態であっても良い。前記培地中の被験物質の濃度としては、通常約1 nM～約1 mMであればよく、約



1 0 nM～約 1 0 0  $\mu$ M が好ましい。培養する時間は、通常 1 時間以上 3 日程度であり、25 時間から 2 日程度が好ましい。

【 0 0 2 7 】

具体的には、サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用を測定する場合には、被験物質を含むサイトカニン非添加培地を用いて培養すればよく、該サイトカニン受容体に対する被験物質のアンタゴニスト作用を測定する場合には、被験物質とサイトカニンとを含む培地を用いて培養すればよい。後者の場合、使用するサイトカニンとしては、trans-zeatin、cis-zeatin、benzyl adenine、thidiazuron等を挙げることができる。該サイトカイニンの濃度としては、通常約 1 nM～約 1 mMであればよく、約 1 0 nM～約 1 0 0  $\mu$ M が好ましいが好ましい。

【 0 0 2 8 】

サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の検出には、後述するような種々の公知の方法を用いることができる。例えば、Sln1遺伝子を欠損させかつPTP2 Tyrosine phosphatase遺伝子 (Ota et al, Proc.N.A.sci.USA, 89, 2355-2359 (1992)) を導入した株であるTM182 (sln1  $\Delta$ ) 株 (Maeda T et al. Nature:369 242-245(1994)) を宿主細胞として使用した場合は、炭素源としてグルコースを用いた培地 (寒天培地または液体培地)、例えばDOLU+Gal培地での本形質転換体の生育の有無を検出すればよい。即ち、被験物質を含むサイトカニン非含有の前記培地を用いて培養した場合、本形質転換体を生育させうる被験物質はサイトカニンアゴニスト活性を有すると判断することができる。また、被験物質とサイトカニンとを含む前記培地を用いて培養した場合、本形質転換体の生育を抑制もしくは阻害しうる被験物質はサイトカニンアンタゴニスト活性を有すると判断することができる。

なお、対照として、炭素源としてグルコースを用いた培地の代わりに炭素源としてガラクトースを用いた培地、例えばDOLU+Gal培地を用いること以外は同様にして培養すると、被験物質の有無に関わらず本形質転換体が生育することを調べても良い。

【 0 0 2 9 】

また、宿主細胞として例えば、Phks遺伝子欠損株である分裂酵母を使用した場合は、顕微鏡下に該分裂酵母の分裂様式を観察すればよい。即ち、被験物質を含むサイトカニン非含有培地を用いて培養した場合、本形質転換体を正常に分裂増殖させる被験物質はサイトカニンアゴニスト活性を有すると判断することができる。RcsC遺伝子を欠損しかつcps-LacZを導入した大腸菌を使用した場合は、X-Galの発色を寒天培地または液体培地で観察すれば良い (Suzuki et al. Plant Cell Physiol 42:107-113(2001))。即ち、被験物質を含むサイトカニン非含有培地を用いて培養した場合、本形質転換体を青色に着色させる被験物質はサイトカニンアゴニスト活性を有すると判断することができる。

#### 【 0 0 3 0 】

前述した方法でサイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用を測定することによって、被験物質の中からサイトカニン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

#### 【 0 0 3 1 】

##### 【発明の効果】

本形質転換体を用いた本発明方法によって、鋭敏で、簡便、迅速に、サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定、およびサイトカニン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングが提供可能になった。

#### 【 0 0 3 2 】

##### 【実施例】

以下、実施例を挙げてさらに詳細に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【 0 0 3 3 】

##### (実施例1) AHK3(AAF99730)cDNAのクローニング

シロイヌナズナのWassilewskija系統の種子を70%のエチルアルコールで1分殺菌し、さらに1.5%の次亜塩素酸ナトリウムで10分間殺菌した。これを滅菌水でよく洗った後、GM培地 (4.3g Murashige and Skoog's basal salt mixture, 1% ss

ucose, 10ml of 5% MES-KOH (pH5.7), 0.3%Phytigel<sup>TM</sup> (SIGMA)) で2週間培養後、5gの植物を得た。これを液体窒素中で凍結させた後、乳鉢により物理的に磨砕した。この植物磨砕物に10mlの抽出バッファー (200mM Tris-HCl (pH8.5)、100mM NaCl、10mM EDTA、0.5% SDS、14mM  $\beta$ メルカプトエタノール) と10gのフェノールの混合液を加えた。Vortex ミキサーで攪拌後、さらに10mlのクロロホルムを加えて激しく攪拌し、10000回転で20分間遠心した。回収した水層にLiClを最終濃度2Mとなるように加え、-80℃で3時間放置後、解凍し、10000回転で20分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿物を2mlのTE (10mM Tris-HCl (pH 8.0) 1mM EDTA)に溶かしたあと、0.2mlの3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)と5mlのエタノールを加えて遠心し、RNAを沈殿として回収した。このRNA 40  $\mu$ gを30unitのFPLCpure<sup>T</sup><sub>M</sub> DnaseI (Amersham-Pharmacia)と60unitのSuperace (Ambion)を加えることにより混在するゲノムDNAを除去した後、フェノールとクロロホルム処理、エタノールによって精製した。SuperscriptII (GIBCO BRL社製)を用い、このRNAに、oligo(dT)12-18 (amersham-Pharmacia)をプライマーとし、SuperscriptII の説明書の推奨する方法によってRT-PCR反応液を調製した。RT-PCR反応は42℃で40分を行い、目的とするcDNAを増幅した。このcDNAを鋳型として、配列番号16に示すDNAおよび配列番号17に示すDNAをプライマーとしてPCR反応を行い、配列番号4で示される塩基配列を有するDNAを増幅した。PCR反応にはHerculase Enhanced DNA Polymerase (TOYOBO)を用い、鋳型DNA500ng、プライマーDNA各々100ngに説明書に従ってdNTPなど反応組成物を添加して50  $\mu$ lの反応液を調整した。PCRの条件は、94℃で1分間保温し、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で4分間のサイクルを41サイクル繰り返すことにより増幅をおこない、目的のDNA断片の増幅を行った。

## 【 0 0 3 4 】

## (実施例2) pHM-1の構築

p415CYC1 (Munberg et al. Gene:156 119-122(1995)) を制限酵素Spe I とBamH Iで消化した後、配列番号18および15に示す合成DNA断片をリンカーとしてT4 DNA Ligaseを用いて挿入し、プラスミドp415CYC1に新たに制限酵素サイトSac I、Apa I、Nhe Iを付加し、pHM-1とした。

## 【 0 0 3 5 】



## (実施例3) AHK3発現ベクターの構築

pHM-1を制限酵素Sal I と Sac I I を用いて切断した後、配列番号4で示される塩基配列を有するDNAをT4 DNA Ligaseを用いて発現ベクターpHM-1のCYC1プロモーター配列に結合して酵母において目的タンパク質の発現が行えるように組み込んだ。挿入されたDNAの塩基配列の配列及び向きが正しいことを自動塩基配列決定装置を用いて確認し、発現プラスミドp415CYC-AHK3を得た。

## 【 0 0 3 6 】

## (実施例4) AHK2(BAB09274)cDNAのクローニング

実施例1で調製した全RNAより逆転写によって調整したcDNAを鋳型として配列番号19に示すDNAおよび配列番号20に示すDNAをプライマーに用いてPCR反応を行い、配列番号2で示される塩基配列を有するDNAを増幅した。PCR反応にはTAKARA Pfu Turbo denature (宝酒造社製) を用い鋳型DNA500ng、プライマーDNA各々50ngに説明書に従ってdNTPなど反応組成物を添加して50 $\mu$ lの反応液を調整した。PCRの条件は、94℃で1分間保温し、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で4分間のサイクルを30サイクル繰り返すことにより増幅をおこない、目的のDNA断片の増幅を行った。

## 【 0 0 3 7 】

## (実施例5) AHK2(BAB09274)変異型cDNAのクローニング

実施例1で調製した全RNAより逆転写によって調整したcDNAを鋳型として、配列番号21に示すDNAおよび配列番号22に示すDNAをプライマーとしてPCR反応を行い、配列番号2の塩基番号586～3531で示される塩基配列の5'末端にATGを付加した塩基配列を有するDNAを増幅した。PCR反応にはTAKARA Pfu Turbo denature (宝酒造社製) を用い鋳型DNA500ng、プライマーDNA各々50ngに説明書に従ってdNTPなど反応組成物を添加して50 $\mu$ lの反応液を調整した。PCRの条件は、94℃で1分間保温し、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で4分間のサイクルを30サイクル繰り返すことにより増幅をおこない、目的のDNAの増幅を行った。

## 【 0 0 3 8 】

(実施例6) AHK2およびAHK2 $\Delta$ 発現ベクターの構築

pHM-1を制限酵素Sac I I とNhe I を用いて切断した後、実施例4および実施例

5で得たDNA断片をT4 DNA Ligaseを用いて発現ベクターpHM-1のCYC1プロモータ配列に結合して酵母において目的タンパク質の発現が行えるように組み込んだ。挿入されたDNAの塩基配列の配列及び向きが正しいことを自動塩基配列決定装置を用いて確認し、発現プラスミドp415CYC-AHK2およびp415CYC-AHK2Δを得た。

## 【 0 0 3 9 】

(実施例7)、本形質転換体TM182-AHK2、TM182-AHK2ΔおよびTM182-AHK3の作製  
得られた発現プラスミドp415CYC-AHK2、p415CYC-AHK2Δおよびp415CYC-AHK3をそれぞれ用いて、Sln1遺伝子欠損株であるTM182 (sln1Δ) (前田 (Maeda T et al. Nature:369 242-245(1994)) を形質転換した。形質転換はPolyethylene glycol/lithium acetate (PEG/LiAc)-mediated transformation 法を用い、CLONTEC H社: MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 User Manual 22ページに記載される VII .Library Transformation & Screening Protocolsに従って行った。得られる形質転換体がロイシンの栄養要求性が消失することを利用し、DOLU+Gal培地で生育する形質転換酵母を選択し、本形質転換体TM182-AHK2、TM182-AHK2ΔおよびTM182-AHK3を得た。

## 【 0 0 4 0 】

(実施例8) 本形質転換体TM182-AHK2、TM182-AHK2ΔおよびTM182-AHK3のサイトカイニン応答

実施例7で得られた本形質転換体TM182-AHK2、TM182-AHK2ΔおよびTM182-AHK3の培養液10μl (酵母約800個体) を、濃度100 nMのtrans-zeatinを添加したDOLU+Gal寒天培地上にスポットして、30℃で30時間培養を行いその生育を観察し、デジタルカメラにて写真を撮影した。

その結果、TM182-AHK2、TM182-AHK2ΔおよびTM182-AHK3のいずれの本形質転換体も、trans-zeatinを添加したDOLU+Gal寒天培地ではtrans-zeatinを添加したDOLU+Gal寒天培地の場合に比べて有意に高い増殖度を示した。このことから、本形質転換体がサイトカイニンに対して応答し、DOLU+Gal寒天培地で生育が可能になることを確認した。また、本形質転換体が、trans-zeatin存在の有無に関わらずDOLU+Gal培地で生育可能であることを確認した。

## 【 0 0 4 1 】

(実施例 9) 本形質転換体 p415CYC-AHK2 $\Delta$  および p415CYC-AHK2 のサイトカイニン応答感受性

実施例 7 で得られた本形質転換体 TM182-AHK2 $\Delta$  および TM182-AHK2、ならびに実施例 15 で得られた形質転換体 TM182-CRE1 の培養液を種々の濃度 (1 nM、10 nM、100 nM、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M) のサイトカイニンを含む DOLU+Gul 寒天培地上にスポットして、30℃ で 30 時間培養を行いその生育を観察し、デジタルカメラにて写真を撮影した。表 1 に、各本形質転換体が生育可能であった trans-zeatin および cis-zeatin の最低濃度を示す。

【0042】

【表 1】

サイトカイニン	AHK2	AHK2 $\Delta$	CRE1a
trans-zeatin	1 $\mu$ M	100nM	10 $\mu$ M
cis-zeatin	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	生育せず

【0043】

(実施例 10) CER1 クローニング用 シロイヌナズナ cDNA フェージライブラリーの作成

シロイヌナズナの Wassilewskija 系統の種子を 70% のエチルアルコールで 1 分殺菌し、さらに 1.5% の次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間殺菌した。これを滅菌水でよく洗った後、GM 培地 (4.3g Murashige and Skoog's basal salt mixture, 1% sucrose, 10ml of 5% MES-KOH (pH5.7), 0.3% Phytigel<sup>TM</sup> (SIGMA)) で 2 週間培養後、5g の植物を得た。これを液体窒素中で凍結させた後、乳鉢により物理的に磨砕し、10ml の抽出バッファー (200mM Tris-HCl (pH8.5)、100mM NaCl、10mM EDTA、0.5% SDS、14mM  $\beta$ メルカプトエタノール) と 10g のフェノールの混合液を加えた。Vortex ミキサーで攪拌後、さらに 10ml のクロロホルムを加えて激しく攪拌し、10000 回転で 20 分間遠心した。回収した水層に LiCl を最終濃度 2M となるように加え、-80℃ で 3 時間放置後、10000 回転で 20 分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿物を 2ml の TE (10mM Tris-HCl (pH 8.0) 1mM EDTA) に溶かしたあと、

0.2mlの3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)と5mlのエタノールを加えて遠心し、RNAを沈殿として回収した。これから、Oligotex<sup>TM</sup> dT30super(日本ロッシュ社製)を用いてpolyAが結合したRNAを回収した。

抽出したpolyAが結合したRNAからのファージcDNAライブラリーの作成はZAP-cDNA RSynthesis Kit (Stratagene社製)を用い、説明書に従って作した。得られたファージcDNAライブラリーの力価は500000PFUであった。

#### 【 0 0 4 4 】

##### (実施例 1 1) CRE 1 a の DNA プローブの作成

作成したファージcDNAライブラリーのファージ液(約1000000PFU)を鋳型として、TAKARA LA Taq<sup>TM</sup>キット(宝酒造社製)を用い、配列番号11に示すDNAおよび配列番号12に示すDNAをプライマーとしてPCR反応を行い、DNAを増幅した。ファージ1000000pfu、プライマーDNA各々0.2 $\mu$ Mにキット説明書に従ってdNTPなど反応組成物を添加して反応液を調整した。PCRの条件は、94℃で2分間保温し、94℃で30秒間、55℃で30秒間、68℃で5分間のサイクルを40サイクル繰り返すことにより増幅をおこない、目的のDNA断片の増幅を行った。次に増幅されたDNAを鋳型にしてMegaprime DNA-labelling system キット(アマシャムファルマシア社製)を用いて増幅DNA断片25ngに32PdCTP 2.0 MBqを添加し、キットに指定される反応組成物を添加して25 $\mu$ lの反応液を調製した。ラベル化反応を37℃10分行うことにより<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブを調整した。

#### 【 0 0 4 5 】

##### (実施例 1 2) CRE1a遺伝子を保持するコロニー(プラーク)の同定

得られたプローブを用いて定法に従ってプラークハイブリダイゼーションを行い目的とするCRE1a遺伝子をクローニングした。ZAP-cDNA RSynthesis Kitの説明書に従い、プラークを形成させた。形成したプラークからニトロセルロースフィルター上にDNAを吸着させた後、紫外線処理をすることにより、フィルター上にDNAを固定させた。調製したフィルターを用いて、6 $\times$ SSC(0.9M NaCl、0.09M クエン酸ナトリウム)、5 $\times$ デンハルト溶液(0.1%(w/v) フィコール400、0.1%(w/v) ポリビニルピロリドン、0.1%BSA)、0.5%(w/v) SDS及び100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNA存在下に、または100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液(

ベーリンガーマンハイム社) 中に65℃で保温した後、1×SSC (0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム) および0.5%SDS存在下に室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC (0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸ナトリウム) および0.5%SDS存在下に、68℃で30分間保温することでハイブリダイズするクローンを得た。

## 【 0 0 4 6 】

## (実施例 1 3) CRE1a cDNAのクローニング

上述のようにして得たクローンのcDNAを鋳型として、配列番号13に示すDNAおよび配列番号14に示すDNAをプライマーとしてPCR反応を行い、配列番号6で示される塩基配列を有するDNAを増幅した。PCR反応にはHerculase Enhanced DNA Polymerase (TOYOBO社製)を用いファージDNA500ng、プライマーDNA各々100ngにキット説明書に従ってdNTPなど反応組成物を添加して50 $\mu$ lの反応液を調整した。PCRの条件は、94℃で1分間保温し、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で4分間のサイクルを25サイクル繰り返すことにより増幅をおこない、目的のDNA断片の増幅を行った。

## 【 0 0 4 7 】

## (実施例 1 4) CRE1a発現ベクターの構築

酵母発現ベクターであるp415CYC1 (Munberg et al. Gene:156 119-122(1995))を制限酵素Sma Iで切断した後、実施例12で得た配列番号6で示される塩基配列を有するDNAをT4 DNA Ligaseを用いて発現ベクターp415CYC1のCYC1プロモータ配列に結合して酵母において目的タンパク質の発現が行えるように組み込んだ。挿入DNAの配列が正しい向きであり、DNA配列が配列番号6に示す塩基配列であることを自動塩基配列決定装置を用いて確認し、発現プラスミドp415CYC-CRE1を得た。

## 【 0 0 4 8 】

## (実施例 1 5) CRE1aを発現する形質転換体の作製

得られたp415CYC-CRE1を用いてSln1遺伝子欠損株であるTM182 (sln1 $\Delta$ ) (前田 (Maeda T et al. Nature:369 242-245(1994)))を形質転換した。形質転換はPolyethylene glycol/lithium acetate (PEG/LiAc)-mediated transformation法を用い、CLONTECH社: MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 User Manual 22ページ

に記載される VII. Library Transformation & Screening Protocolsに従って行った。得られる形質転換体がロイシンの栄養要求性が消失することを利用し、DOLU+Gal培地で生育する株を選択しTM182-CRE1を得た。

TM182-CRE1の培養液10 $\mu$ l（酵母約800個体）を濃度100 $\mu$ Mの Trans-zeatinを含むDOLU+Gal寒天培地にスポットして30℃で2日間培養を行い、本形質転換体がtrans-zeatinに対して応答し、DOLU+Gal寒天培地で生育が可能になることを確認した。また、該TM182-CRE1が、trans-zeatinの添加の有無に関わらず DOLU+Gal培地で生育可能であることを確認した。

#### 【 0 0 4 9 】

（実施例16）液体培地を用いたサイトカニンアゴニスト作用を有する物質のスクリーニング

実施例7で得た本形質転換体TM182-AHK2 $\Delta$ をDOLU+Gal培地200mlに植菌し、30℃で30時間前培養を行い、前培養液とする。

96穴プレートの各ウェルに入れた200 $\mu$ lのDOLU+Gal培地に被験物質を1 $\mu$ Mとなるように秤量して添加したアッセイプレートを準備し、同時に、200 $\mu$ lのDOLU+Gal培地のみ入れたアッセイプレートをコントロール用として準備する。

前記前培養液を20 $\mu$ lずつ両プレートの各ウェルに添加し、30℃で30時間培養した後、プレートリーダーを用いて各ウェルの濁度を測定する。該濁度をコントロールと比較することによって、被験物質の添加効果を調べる。被験物質を添加した培地の濁度がコントロールに比べて濁度が高かった被験物質を、サイトカニンアゴニスト候補物質として選抜する。

#### 【 0 0 5 0 】

（実施例17）液体培地を用いたサイトカニンアンタゴニスト作用を有する物質のスクリーニング

実施例7で得た本形質転換体TM182-AHK2 $\Delta$ をDOLU+Gal培地200mlに植菌し、30℃で30時間前培養を行い、前培養液とする。

96穴プレートの各ウェルに1 $\mu$ Mのtrans-zeatinを添加したDOLU+Gal培地を200 $\mu$ l入れて、各ウェルに被験物質を1 $\mu$ Mとなるようにさらに添加したアッセイプレートを準備した。同時に、1 $\mu$ Mのtrans-zeatinを添加したDOLU+Gal培地のみを



200  $\mu$ l 入れたアッセイプレートをコントロール用として準備する。

前記前培養液を20  $\mu$ l ずつ両プレートの各ウェルに添加し、30℃で30時間培養した後、プレートリーダーを用いて各ウェルの濁度を測定する。該濁度をコントロールと比較することによって、被験物質の添加効果を調べる。被験物質を添加した培地の濁度がコントロールに比べて濁度が低かった被験物質を、サイトカイニンアンタゴニスト候補物質として選抜する。

#### 【 0 0 5 1 】

(実施例 1 8) 固体培地を用いたサイトカイニンアゴニスト作用を有する物質のスクリーニング

実施例7で得た形質転換体 (TM182-AHK2  $\Delta$ ) を DOLU+Gal 培地 200ml に植菌し、30℃で30時間前培養を行う。実施例16で選抜したサイトカイニンアゴニスト候補物質を10 nM から 100  $\mu$  M となるように濃度を種々変化させて添加した DOLU+Gal 寒天培地に、10  $\mu$  l の前培養した形質転換体 (TM182-AHK2  $\Delta$  2) をスポットして30℃で30時間培養する。形質転換体 (TM182-AHK2  $\Delta$ ) の増殖が観察される候補物質の最低濃度から候補物質のサイトカイニンアゴニスト作用を測定する。

#### 【 0 0 5 2 】

(実施例 1 9) 固体培地を用いたサイトカイニンアンタゴニスト作用を有する物質のスクリーニング

実施例7で得た形質転換体 (TM182-AHK2  $\Delta$ ) を DOLU+Gal 培地 200ml に植菌し、30℃で30時間前培養を行う。実施例 1 7 で選抜したサイトカイニンアンタゴニスト候補物質を10 nM から 100  $\mu$  M となるように濃度を種々変化させ、10  $\mu$  M の trans-zeatin と共に添加した DOLU+Gal 寒天培地に、10  $\mu$  l の前培養した形質転換体 (TM182-AHK2  $\Delta$  2) をスポットして30℃で30時間培養する。形質転換体 (TM182-AHK2  $\Delta$ ) の増殖が観察されない候補物質の最低濃度から候補物質のサイトカイニンアンタゴニスト作用を測定する。

#### 【 0 0 5 3 】

以下に、実施例等を使用した培地の組成を記す。

(a) DOLU+GLU 培地

Bacto-yeast nitrogen base without amino acids	6.7g
---	------

Glucose	20g
Drop-out mix (x)	2.0g
Distilled water	1000ml

(b) DOLU+GAL培地

Bacto-yeast nitrogen base without amino acids	6.7g
Glucose	20g
Drop-out mix (x)	2.0g
Distilled water	1000ml

(x) Drop-out mix:

Adenine	0.5g	Lysine	2.0g
Alanine	2.0g	Methionine	2.0g
Arginine	2.0g	para-Aminobenzoic acid	0.2g
Asparagine	2.0g	Phenylalanine	2.0g
Aspartic acid	2.0g	Proline	2.0g
Cysteine	2.0g	Serine	2.0g
Glutamine	2.0g	Threonine	2.0g
Glutamic acid	2.0g	Tryptophan	2.0g
Glycine	2.0g	Tyrosine	2.0g
Histidine	2.0g	Valine	2.0g
Inositol	2.0g	Isoleucine	2.0g
Distilled water	1000ml		

(c) DOLU+GLU寒天培地

培地 (a) に 2 % (W/V) の寒天を添加した固体培地。

(d) DOLU+GAL寒天培地

培地 (c) に 2 % (W/V) の寒天を添加した固体培地。

【 0 0 5 4 】



「配列表フリーテキスト」

配列番号 9

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 0

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 1

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 2

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 3

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 4

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 5

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 6

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 7

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 8

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 9

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 0

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 1

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 2

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

【 0 0 5 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Co., Ltd.

<120> Method for measurement of agonists activity or antagonists activity

<130> P152622

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3531

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3531)

<400> 1

atg tct ata act tgt gag ctc ttg aat ctt act tca aag aaa gct aag 48

Met Ser Ile Thr Cys Glu Leu Leu Asn Leu Thr Ser Lys Lys Ala Lys

1

5

10

15

aag tcg tcg agc agt gac aag aaa tgg cta aag aag cct ctc ttc ttc 96

Lys Ser Ser Ser Ser Asp Lys Lys Trp Leu Lys Lys Pro Leu Phe Phe

20

25

30

ctg att ttg tgt ggc tct ttg gta att gtt ttg gtt atg ttc tta cgg 144

Leu Ile Leu Cys Gly Ser Leu Val Ile Val Leu Val Met Phe Leu Arg

35

40

45

tta ggt aga agt cag aag gag gag aca gat tct tgt aat gga gaa gag 192

Leu Gly Arg Ser Gln Lys Glu Glu Thr Asp Ser Cys Asn Gly Glu Glu

50

55

60

aaa gtg ttg tat aga cat caa aat gtc aca aga agt gag att cat gat 240

Lys Val Leu Tyr Arg His Gln Asn Val Thr Arg Ser Glu Ile His Asp

65

70

75

80

ttg gtc tct ttg ttc tct gat tca gat cag gta aca tcc ttt gaa tgt 288

Leu Val Ser Leu Phe Ser Asp Ser Asp Gln Val Thr Ser Phe Glu Cys

85

90

95

cat aag gaa tca agc cct gga atg tgg aca aac tat ggt att aca tgt 336

His Lys Glu Ser Ser Pro Gly Met Trp Thr Asn Tyr Gly Ile Thr Cys

100

105

110

tcc ctg agt gtg cgt tct gat aaa caa gag act aga ggg ctt ccc tgg 384

Ser Leu Ser Val Arg Ser Asp Lys Gln Glu Thr Arg Gly Leu Pro Trp

115

120

125

aat ctt ggc tta gga cat tct atc tca tca aca tct tgt atg tgt ggt 432  
 Asn Leu Gly Leu Gly His Ser Ile Ser Ser Thr Ser Cys Met Cys Gly  
 130 135 140

aat ctt gaa ccg att tta cag caa cct gaa aac ctt gag gaa gaa aac 480  
 Asn Leu Glu Pro Ile Leu Gln Gln Pro Glu Asn Leu Glu Glu Glu Asn  
 145 150 155 160

cat gaa gaa ggg ctg gag cag ggt ttg tca tcg tat tta aga aat gca 528  
 His Glu Glu Gly Leu Glu Gln Gly Leu Ser Ser Tyr Leu Arg Asn Ala  
 165 170 175

tgg tgg tgt cta atc ctt ggt gtg tta gtg tgc cat aag att tat gta 576  
 Trp Trp Cys Leu Ile Leu Gly Val Leu Val Cys His Lys Ile Tyr Val  
 180 185 190

tct cat tct aaa gca cga ggt gag agg aaa gag aaa gta cat ctg caa 624  
 Ser His Ser Lys Ala Arg Gly Glu Arg Lys Glu Lys Val His Leu Gln  
 195 200 205

gag gct tta gct cca aag aag cag caa caa cgt gct cag act tct tct 672  
 Glu Ala Leu Ala Pro Lys Lys Gln Gln Gln Arg Ala Gln Thr Ser Ser  
 210 215 220

aga ggg gct gga aga tgg agg aag aat atc ctt ctc ctt ggt att tta 720  
 Arg Gly Ala Gly Arg Trp Arg Lys Asn Ile Leu Leu Leu Gly Ile Leu  
 225 230 235 240

gga gga gtt tcc ttc tct gtt tgg tgg ttt tgg gac act aat gag gag 768

Gly Gly Val Ser Phe Ser Val Trp Trp Phe Trp Asp Thr Asn Glu Glu  
245 250 255

atc ata atg aaa agg agg gag act ttg gca aac atg tgt gac gaa cga 816  
Ile Ile Met Lys Arg Arg Glu Thr Leu Ala Asn Met Cys Asp Glu Arg  
260 265 270

gca cgt gtt tta caa gat cag ttc aat gtt agc ttg aac cat gtt cat 864  
Ala Arg Val Leu Gln Asp Gln Phe Asn Val Ser Leu Asn His Val His  
275 280 285

gcc ttg tct att ctt gta tct aca ttt cat cat ggt aaa atc cca tct 912  
Ala Leu Ser Ile Leu Val Ser Thr Phe His His Gly Lys Ile Pro Ser  
290 295 300

gcc att gat cag aga aca ttt gaa gaa tat act gag aga aca aac ttt 960  
Ala Ile Asp Gln Arg Thr Phe Glu Glu Tyr Thr Glu Arg Thr Asn Phe  
305 310 315 320

gag agg cca ctt act agt ggt gta gcg tat gct ttg aaa gtc cca cac 1008  
Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Ala Tyr Ala Leu Lys Val Pro His  
325 330 335

tca gaa aga gag aaa ttt gaa aag gag cat gga tgg gca ata aag aaa 1056  
Ser Glu Arg Glu Lys Phe Glu Lys Glu His Gly Trp Ala Ile Lys Lys  
340 345 350

atg gaa act gag gac cag aca gtt gta caa gat tgt gtt cct gaa aac 1104  
Met Glu Thr Glu Asp Gln Thr Val Val Gln Asp Cys Val Pro Glu Asn

355	360	365	
ttt gat ccc gca ccg att caa gac gaa tac gcg cca gtt ata ttt gct	1152		
Phe Asp Pro Ala Pro Ile Gln Asp Glu Tyr Ala Pro Val Ile Phe Ala			
370	375	380	
caa gaa act gtt tcc cat att gta tcg gtc gac atg atg tct gga gaa	1200		
Gln Glu Thr Val Ser His Ile Val Ser Val Asp Met Met Ser Gly Glu			
385	390	395	400
gaa gac cgt gaa aac atc tta cgg gca agg gca tca gga aaa gga gtg	1248		
Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Ala Ser Gly Lys Gly Val			
405	410	415	
tta aca tct cca ttt aag ctt ctt aag tca aat cat ctt ggt gtt gtg	1296		
Leu Thr Ser Pro Phe Lys Leu Leu Lys Ser Asn His Leu Gly Val Val			
420	425	430	
ttg acc ttt gct gtc tat gac acg agc cta ccg cct gat gct aca gaa	1344		
Leu Thr Phe Ala Val Tyr Asp Thr Ser Leu Pro Pro Asp Ala Thr Glu			
435	440	445	
gaa cag cgt gtt gaa gca act att ggg tac ctt ggt gca tca tat gat	1392		
Glu Gln Arg Val Glu Ala Thr Ile Gly Tyr Leu Gly Ala Ser Tyr Asp			
450	455	460	
atg cca tcg ctg gtg gag aaa ctt ctt cac caa ctt gcc agc aaa cag	1440		
Met Pro Ser Leu Val Glu Lys Leu Leu His Gln Leu Ala Ser Lys Gln			
465	470	475	480

aca att gct gtg gat gtt tac gac aca act aac act tca ggt cta ata	1488
Thr Ile Ala Val Asp Val Tyr Asp Thr Thr Asn Thr Ser Gly Leu Ile	
485 490 495	
aaa atg tat ggc tca gaa att ggg gat ata agt gag cag cat ata agt	1536
Lys Met Tyr Gly Ser Glu Ile Gly Asp Ile Ser Glu Gln His Ile Ser	
500 505 510	
agc ctt gat ttt ggt gat cca tca agg aac cat gag atg cat tgc agg	1584
Ser Leu Asp Phe Gly Asp Pro Ser Arg Asn His Glu Met His Cys Arg	
515 520 525	
ttt aag cat aaa ctt ccc att ccc tgg aca gcg ata aca ccg tcg atc	1632
Phe Lys His Lys Leu Pro Ile Pro Trp Thr Ala Ile Thr Pro Ser Ile	
530 535 540	
tta gtt ctg gtt att act ttt ctt gtt ggt tat att tta tat gaa gcc	1680
Leu Val Leu Val Ile Thr Phe Leu Val Gly Tyr Ile Leu Tyr Glu Ala	
545 550 555 560	
atc aac cga att gcg aca gtt gaa gag gat tgt cag aag atg agg gaa	1728
Ile Asn Arg Ile Ala Thr Val Glu Glu Asp Cys Gln Lys Met Arg Glu	
565 570 575	
ctc aaa gct cgt gct gag gcc gct gac att gca aag tca cag ttc cta	1776
Leu Lys Ala Arg Ala Glu Ala Ala Asp Ile Ala Lys Ser Gln Phe Leu	
580 585 590	

gca act gtt tct cat gag ata cgg act ccg atg aat gga gtt tta gga 1824  
Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Val Leu Gly  
595 600 605

atg ctg aaa atg ctg atg gac acc gat ctt gat gcg aag cag atg gac 1872  
Met Leu Lys Met Leu Met Asp Thr Asp Leu Asp Ala Lys Gln Met Asp  
610 615 620

tat gcg caa act gct cat ggc agt ggg aag gat ctt aca tca cta ata 1920  
Tyr Ala Gln Thr Ala His Gly Ser Gly Lys Asp Leu Thr Ser Leu Ile  
625 630 635 640

aat gag gtt ctt gat cag gca aag att gaa tcc gga agg ctc gag ctt 1968  
Asn Glu Val Leu Asp Gln Ala Lys Ile Glu Ser Gly Arg Leu Glu Leu  
645 650 655

gaa aat gtg cct ttt gat atg cgt ttt att ctt gat aat gtt tca tct 2016  
Glu Asn Val Pro Phe Asp Met Arg Phe Ile Leu Asp Asn Val Ser Ser  
660 665 670

ctc ctc tct ggc aag gca aat gaa aaa gga att gag ttg gcc gtt tat 2064  
Leu Leu Ser Gly Lys Ala Asn Glu Lys Gly Ile Glu Leu Ala Val Tyr  
675 680 685

gtt tct agt caa gtt cct gat gtt gta gtc ggt gat ccg agt cgg ttc 2112  
Val Ser Ser Gln Val Pro Asp Val Val Val Gly Asp Pro Ser Arg Phe  
690 695 700

cgg cag atc att aca aac ctg gtt gga aac tca atc aaa ttc aca cag 2160



Arg Gln Ile Ile Thr Asn Leu Val Gly Asn Ser Ile Lys Phe Thr Gln  
705 710 715 720

gaa agg gga cac ata ttt atc tca gtg cac ctt gca gat gag gta aag 2208  
Glu Arg Gly His Ile Phe Ile Ser Val His Leu Ala Asp Glu Val Lys  
725 730 735

gag cct ctt act att gaa gac gca gtg cta aaa cag cga cta gct tta 2256  
Glu Pro Leu Thr Ile Glu Asp Ala Val Leu Lys Gln Arg Leu Ala Leu  
740 745 750

gga tgc agc gag tcc ggt gag aca gtt agc ggg ttt cct gcg gta aat 2304  
Gly Cys Ser Glu Ser Gly Glu Thr Val Ser Gly Phe Pro Ala Val Asn  
755 760 765

gca tgg gga agc tgg aag aat ttc aag aca tgt tac agt act gag agt 2352  
Ala Trp Gly Ser Trp Lys Asn Phe Lys Thr Cys Tyr Ser Thr Glu Ser  
770 775 780

cag aat tct gat caa atc aaa ttg cta gtt aca gtg gag gac act gga 2400  
Gln Asn Ser Asp Gln Ile Lys Leu Leu Val Thr Val Glu Asp Thr Gly  
785 790 795 800

gtt ggc ata cct gtg gat gca caa ggc cga atc ttc aca cct ttt atg 2448  
Val Gly Ile Pro Val Asp Ala Gln Gly Arg Ile Phe Thr Pro Phe Met  
805 810 815

caa gcc gac agt tcc aca tcg cgg act tat ggt gga act ggc ata ggt 2496  
Gln Ala Asp Ser Ser Thr Ser Arg Thr Tyr Gly Gly Thr Gly Ile Gly

820	825	830	
ttg agt ata agc aaa cgt ttg gtt gaa ctc atg caa gga gag atg ggg			2544
Leu Ser Ile Ser Lys Arg Leu Val Glu Leu Met Gln Gly Glu Met Gly			
835	840	845	
ttt gtg agt gag ccc ggg ata ggc agt act ttt tca ttt act gga gtt			2592
Phe Val Ser Glu Pro Gly Ile Gly Ser Thr Phe Ser Phe Thr Gly Val			
850	855	860	
ttc ggg aaa gca gaa aca aat acg tcg att act aag ctg gaa cga ttc			2640
Phe Gly Lys Ala Glu Thr Asn Thr Ser Ile Thr Lys Leu Glu Arg Phe			
865	870	875	880
gat cta gct att cag gag ttt aca gga ttg aga gca tta gtt att gat			2688
Asp Leu Ala Ile Gln Glu Phe Thr Gly Leu Arg Ala Leu Val Ile Asp			
885	890	895	
aac aga aac att aga gca gag gtc acc agg tac gaa ctt cgg aga ctg			2736
Asn Arg Asn Ile Arg Ala Glu Val Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Arg Leu			
900	905	910	
gga ata tct gca gac att gtt tca agt ctg aga atg gca tgc act tgt			2784
Gly Ile Ser Ala Asp Ile Val Ser Ser Leu Arg Met Ala Cys Thr Cys			
915	920	925	
tgt atc agc aaa tta gaa aat ttg gct atg att cta ata gac aaa gac			2832
Cys Ile Ser Lys Leu Glu Asn Leu Ala Met Ile Leu Ile Asp Lys Asp			
930	935	940	

gcc tgg aac aag gaa gaa ttt tca gta ctt gac gag ttg ttt acc cga 2880

Ala Trp Asn Lys Glu Glu Phe Ser Val Leu Asp Glu Leu Phe Thr Arg

945 950 955 960

agc aaa gta acc ttt aca aga gtc cca aag att ttt ctt ttg gca act 2928

Ser Lys Val Thr Phe Thr Arg Val Pro Lys Ile Phe Leu Leu Ala Thr

965 970 975

tct gca act ctt act gag cgc agt gag atg aag tct act ggt ctc atc 2976

Ser Ala Thr Leu Thr Glu Arg Ser Glu Met Lys Ser Thr Gly Leu Ile

980 985 990

gat gag gtg gtg ata aag cct ctt cgg atg agt gtc tta ata tgt tgc 3024

Asp Glu Val Val Ile Lys Pro Leu Arg Met Ser Val Leu Ile Cys Cys

995 1000 1005

ttg caa gaa acc ctt gtc aat ggc aag aag agg caa ccg aac aga cag 3072

Leu Gln Glu Thr Leu Val Asn Gly Lys Lys Arg Gln Pro Asn Arg Gln

1010 1015 1020

cga aga aat ctt gga cac ttg cta aga gaa aaa cag att ctg gtt gtg 3120

Arg Arg Asn Leu Gly His Leu Leu Arg Glu Lys Gln Ile Leu Val Val

1025 1030 1035 1040

gat gat aat ctt gtg aac aga cga gtt gca gaa ggt gca ctt aag aaa 3168

Asp Asp Asn Leu Val Asn Arg Arg Val Ala Glu Gly Ala Leu Lys Lys

1045 1050 1055

tat gga gct att gtt aca tgc gtt gag agt ggc aaa gct gca ttg gca	3216
Tyr Gly Ala Ile Val Thr Cys Val Glu Ser Gly Lys Ala Ala Leu Ala	
1060	1065
1070	
atg ctt aag ccg cct cat aac ttc gat gct tgc ttc atg gat ctc cag	3264
Met Leu Lys Pro Pro His Asn Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Leu Gln	
1075	1080
1085	
atg cct gaa atg gat gga ttt gaa gcg aca agg aga gtc cgt gag ctg	3312
Met Pro Glu Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Arg Val Arg Glu Leu	
1090	1095
1100	
gag agg gaa atc aat aag aaa ata gct tct gga gaa gtt tca gct gaa	3360
Glu Arg Glu Ile Asn Lys Lys Ile Ala Ser Gly Glu Val Ser Ala Glu	
1105	1110
1115	1120
atg ttc tgt aaa ttt agt agt tgg cac gtc ccg ata tta gca atg aca	3408
Met Phe Cys Lys Phe Ser Ser Trp His Val Pro Ile Leu Ala Met Thr	
1125	1130
1135	
gca gat gtt att cag gct act cat gaa gaa tgc atg aaa tgt gga atg	3456
Ala Asp Val Ile Gln Ala Thr His Glu Glu Cys Met Lys Cys Gly Met	
1140	1145
1150	
gat ggt tat gta tca aaa ccg ttt gaa gag gaa gtg ctc tac aca gcg	3504
Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Val Leu Tyr Thr Ala	
1155	1160
1165	
gta gca aga ttc ttt gaa cct tgt taa	3531

Val Ala Arg Phe Phe Glu Pro Cys

1170

1175

<210> 2

<211> 1176

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

Met Ser Ile Thr Cys Glu Leu Leu Asn Leu Thr Ser Lys Lys Ala Lys

1

5

10

15

Lys Ser Ser Ser Ser Asp Lys Lys Trp Leu Lys Lys Pro Leu Phe Phe

20

25

30

Leu Ile Leu Cys Gly Ser Leu Val Ile Val Leu Val Met Phe Leu Arg

35

40

45

Leu Gly Arg Ser Gln Lys Glu Glu Thr Asp Ser Cys Asn Gly Glu Glu

50

55

60

Lys Val Leu Tyr Arg His Gln Asn Val Thr Arg Ser Glu Ile His Asp

65

70

75

80

Leu Val Ser Leu Phe Ser Asp Ser Asp Gln Val Thr Ser Phe Glu Cys

85

90

95

His Lys Glu Ser Ser Pro Gly Met Trp Thr Asn Tyr Gly Ile Thr Cys

100

105

110

Ser Leu Ser Val Arg Ser Asp Lys Gln Glu Thr Arg Gly Leu Pro Trp

115

120

125

Asn Leu Gly Leu Gly His Ser Ile Ser Ser Thr Ser Cys Met Cys Gly

130

135

140

Asn Leu Glu Pro Ile Leu Gln Gln Pro Glu Asn Leu Glu Glu Glu Asn

145	150	155	160
His Glu Glu Gly Leu Glu Gln Gly Leu Ser Ser Tyr Leu Arg Asn Ala			
	165	170	175
Trp Trp Cys Leu Ile Leu Gly Val Leu Val Cys His Lys Ile Tyr Val			
	180	185	190
Ser His Ser Lys Ala Arg Gly Glu Arg Lys Glu Lys Val His Leu Gln			
	195	200	205
Glu Ala Leu Ala Pro Lys Lys Gln Gln Gln Arg Ala Gln Thr Ser Ser			
	210	215	220
Arg Gly Ala Gly Arg Trp Arg Lys Asn Ile Leu Leu Leu Gly Ile Leu			
225	230	235	240
Gly Gly Val Ser Phe Ser Val Trp Trp Phe Trp Asp Thr Asn Glu Glu			
	245	250	255
Ile Ile Met Lys Arg Arg Glu Thr Leu Ala Asn Met Cys Asp Glu Arg			
	260	265	270
Ala Arg Val Leu Gln Asp Gln Phe Asn Val Ser Leu Asn His Val His			
	275	280	285
Ala Leu Ser Ile Leu Val Ser Thr Phe His His Gly Lys Ile Pro Ser			
	290	295	300
Ala Ile Asp Gln Arg Thr Phe Glu Glu Tyr Thr Glu Arg Thr Asn Phe			
305	310	315	320
Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Ala Tyr Ala Leu Lys Val Pro His			
	325	330	335
Ser Glu Arg Glu Lys Phe Glu Lys Glu His Gly Trp Ala Ile Lys Lys			
	340	345	350
Met Glu Thr Glu Asp Gln Thr Val Val Gln Asp Cys Val Pro Glu Asn			
	355	360	365
Phe Asp Pro Ala Pro Ile Gln Asp Glu Tyr Ala Pro Val Ile Phe Ala			
	370	375	380



Gln Glu Thr Val Ser His Ile Val Ser Val Asp Met Met Ser Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Ala Ser Gly Lys Gly Val  
 405 410 415  
 Leu Thr Ser Pro Phe Lys Leu Leu Lys Ser Asn His Leu Gly Val Val  
 420 425 430  
 Leu Thr Phe Ala Val Tyr Asp Thr Ser Leu Pro Pro Asp Ala Thr Glu  
 435 440 445  
 Glu Gln Arg Val Glu Ala Thr Ile Gly Tyr Leu Gly Ala Ser Tyr Asp  
 450 455 460  
 Met Pro Ser Leu Val Glu Lys Leu Leu His Gln Leu Ala Ser Lys Gln  
 465 470 475 480  
 Thr Ile Ala Val Asp Val Tyr Asp Thr Thr Asn Thr Ser Gly Leu Ile  
 485 490 495  
 Lys Met Tyr Gly Ser Glu Ile Gly Asp Ile Ser Glu Gln His Ile Ser  
 500 505 510  
 Ser Leu Asp Phe Gly Asp Pro Ser Arg Asn His Glu Met His Cys Arg  
 515 520 525  
 Phe Lys His Lys Leu Pro Ile Pro Trp Thr Ala Ile Thr Pro Ser Ile  
 530 535 540  
 Leu Val Leu Val Ile Thr Phe Leu Val Gly Tyr Ile Leu Tyr Glu Ala  
 545 550 555 560  
 Ile Asn Arg Ile Ala Thr Val Glu Glu Asp Cys Gln Lys Met Arg Glu  
 565 570 575  
 Leu Lys Ala Arg Ala Glu Ala Ala Asp Ile Ala Lys Ser Gln Phe Leu  
 580 585 590  
 Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Val Leu Gly  
 595 600 605  
 Met Leu Lys Met Leu Met Asp Thr Asp Leu Asp Ala Lys Gln Met Asp

610	615	620
Tyr Ala Gln Thr Ala His Gly Ser Gly Lys Asp Leu Thr Ser Leu Ile		
625	630	635
Asn Glu Val Leu Asp Gln Ala Lys Ile Glu Ser Gly Arg Leu Glu Leu		640
	645	650
Glu Asn Val Pro Phe Asp Met Arg Phe Ile Leu Asp Asn Val Ser Ser		655
	660	665
Leu Leu Ser Gly Lys Ala Asn Glu Lys Gly Ile Glu Leu Ala Val Tyr		670
	675	680
Val Ser Ser Gln Val Pro Asp Val Val Val Gly Asp Pro Ser Arg Phe		685
	690	695
Arg Gln Ile Ile Thr Asn Leu Val Gly Asn Ser Ile Lys Phe Thr Gln		700
705	710	715
Glu Arg Gly His Ile Phe Ile Ser Val His Leu Ala Asp Glu Val Lys		720
	725	730
Glu Pro Leu Thr Ile Glu Asp Ala Val Leu Lys Gln Arg Leu Ala Leu		735
	740	745
Gly Cys Ser Glu Ser Gly Glu Thr Val Ser Gly Phe Pro Ala Val Asn		750
	755	760
Ala Trp Gly Ser Trp Lys Asn Phe Lys Thr Cys Tyr Ser Thr Glu Ser		765
	770	775
Gln Asn Ser Asp Gln Ile Lys Leu Leu Val Thr Val Glu Asp Thr Gly		780
785	790	795
Val Gly Ile Pro Val Asp Ala Gln Gly Arg Ile Phe Thr Pro Phe Met		800
	805	810
Gln Ala Asp Ser Ser Thr Ser Arg Thr Tyr Gly Gly Thr Gly Ile Gly		815
	820	825
Leu Ser Ile Ser Lys Arg Leu Val Glu Leu Met Gln Gly Glu Met Gly		830
	835	840
		845

Phe Val Ser Glu Pro Gly Ile Gly Ser Thr Phe Ser Phe Thr Gly Val  
 850 855 860  
 Phe Gly Lys Ala Glu Thr Asn Thr Ser Ile Thr Lys Leu Glu Arg Phe  
 865 870 875 880  
 Asp Leu Ala Ile Gln Glu Phe Thr Gly Leu Arg Ala Leu Val Ile Asp  
 885 890 895  
 Asn Arg Asn Ile Arg Ala Glu Val Thr Arg Tyr Glu Leu Arg Arg Leu  
 900 905 910  
 Gly Ile Ser Ala Asp Ile Val Ser Ser Leu Arg Met Ala Cys Thr Cys  
 915 920 925  
 Cys Ile Ser Lys Leu Glu Asn Leu Ala Met Ile Leu Ile Asp Lys Asp  
 930 935 940  
 Ala Trp Asn Lys Glu Glu Phe Ser Val Leu Asp Glu Leu Phe Thr Arg  
 945 950 955 960  
 Ser Lys Val Thr Phe Thr Arg Val Pro Lys Ile Phe Leu Leu Ala Thr  
 965 970 975  
 Ser Ala Thr Leu Thr Glu Arg Ser Glu Met Lys Ser Thr Gly Leu Ile  
 980 985 990  
 Asp Glu Val Val Ile Lys Pro Leu Arg Met Ser Val Leu Ile Cys Cys  
 995 1000 1005  
 Leu Gln Glu Thr Leu Val Asn Gly Lys Lys Arg Gln Pro Asn Arg Gln  
 1010 1015 1020  
 Arg Arg Asn Leu Gly His Leu Leu Arg Glu Lys Gln Ile Leu Val Val  
 1025 1030 1035 1040  
 Asp Asp Asn Leu Val Asn Arg Arg Val Ala Glu Gly Ala Leu Lys Lys  
 1045 1050 1055  
 Tyr Gly Ala Ile Val Thr Cys Val Glu Ser Gly Lys Ala Ala Leu Ala  
 1060 1065 1070  
 Met Leu Lys Pro Pro His Asn Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Leu Gln

1075	1080	1085
Met Pro Glu Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Arg Val Arg Glu Leu		
1090	1095	1100
Glu Arg Glu Ile Asn Lys Lys Ile Ala Ser Gly Glu Val Ser Ala Glu		
1105	1110	1115
Met Phe Cys Lys Phe Ser Ser Trp His Val Pro Ile Leu Ala Met Thr		1120
	1125	1130
		1135
Ala Asp Val Ile Gln Ala Thr His Glu Glu Cys Met Lys Cys Gly Met		
1140	1145	1150
Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Val Leu Tyr Thr Ala		
1155	1160	1165
Val Ala Arg Phe Phe Glu Pro Cys		
1170	1175	

<210> 3

<211> 3111

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3111)

<400> 3

atg agt ctg ttc cat gtg cta ggg ttt ggt gtc aag att ggg cat ctc 48

Met Ser Leu Phe His Val Leu Gly Phe Gly Val Lys Ile Gly His Leu

1

5

10

15

ttc tgg atg cta tgc tgc tgg ttt gtt tct tgg ttc gtt gat aat ggg 96

Phe Trp Met Leu Cys Cys Trp Phe Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Gly

20

25

30

atc gag gac aag tct ggt ctt tta gtt ggc tct gtc ggt gat ctt gag 144

Ile Glu Asp Lys Ser Gly Leu Leu Val Gly Ser Val Gly Asp Leu Glu

35

40

45

aag act aag atg act acg ttg aag aag aag aac aag atg tgg ttc tgg 192

Lys Thr Lys Met Thr Thr Leu Lys Lys Lys Asn Lys Met Trp Phe Trp

50

55

60

aat aag atc tct agc agc gga ctc aag atc ccg agt ttc tct tat cag 240

Asn Lys Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Ile Pro Ser Phe Ser Tyr Gln

65

70

75

80

ttt ctt ggc tct gtt aaa ttc aac aag gcg tgg tgg agg aag ctt gtg 288

Phe Leu Gly Ser Val Lys Phe Asn Lys Ala Trp Trp Arg Lys Leu Val

85

90

95

gtg gtt tgg gtt gtc ttc tgg gtc ttg gtc tct att tgg acg ttt tgg 336

Val Val Trp Val Val Phe Trp Val Leu Val Ser Ile Trp Thr Phe Trp

100

105

110

tac ttt agc tcg caa gct atg gag aag agg aaa gag acg cta gct agt 384

Tyr Phe Ser Ser Gln Ala Met Glu Lys Arg Lys Glu Thr Leu Ala Ser

115

120

125

atg tgt gat gag aga gct cgt atg ctg cag gat cag ttc aac gtt agc 432  
Met Cys Asp Glu Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Asn Val Ser  
130 135 140

atg aat cat gtt caa gcc atg tct atc ttg atc tca acc ttc cac cat 480  
Met Asn His Val Gln Ala Met Ser Ile Leu Ile Ser Thr Phe His His  
145 150 155 160

ggc aag att cct tct gct atc gat cag aga aca ttc tca gag tac act 528  
Gly Lys Ile Pro Ser Ala Ile Asp Gln Arg Thr Phe Ser Glu Tyr Thr  
165 170 175

gat aga act tcc ttt gag agg cct ctt act agc ggg gta gct tat gct 576  
Asp Arg Thr Ser Phe Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Ala Tyr Ala  
180 185 190

atg agg gtg ctc cat tca gag agg gaa gag ttc gag agg caa caa ggt 624  
Met Arg Val Leu His Ser Glu Arg Glu Glu Phe Glu Arg Gln Gln Gly  
195 200 205

tgg act att agg aag atg tat tct ctt gaa caa aac cca gtt cac aag 672  
Trp Thr Ile Arg Lys Met Tyr Ser Leu Glu Gln Asn Pro Val His Lys  
210 215 220

gat gac tat gac ctg gaa gct ttg gaa cca tcc cct gtc caa gaa gag 720  
Asp Asp Tyr Asp Leu Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Val Gln Glu Glu  
225 230 235 240

tac gct cca gtc atc ttt gct cag gac act gtt tct cac gtt gtt tct 768

245 250 255

260 265 270

275                      280                      285

**290**

**305**

**310**

**315**

**320**

**325**

**340**



355	360	365	
gat ggg ttg gaa cgt gtt agt cca cta atc ttt ggc gat cca ttg aga 1152			
Asp Gly Leu Glu Arg Val Ser Pro Leu Ile Phe Gly Asp Pro Leu Arg			
370	375	380	
aag cat gag atg cgt tgc aga ttt aag cag aaa cca cca tgg cca gtg 1200			
Lys His Glu Met Arg Cys Arg Phe Lys Gln Lys Pro Pro Trp Pro Val			
385	390	395	400
cta tca atg gtg aca tca ttc ggt atc ctt gtg att gcg tta ctt gtt 1248			
Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Gly Ile Leu Val Ile Ala Leu Leu Val			
405	410	415	
gca cat ata atc cac gca acc gtt agt cga ata cac aaa gtt gaa gaa 1296			
Ala His Ile Ile His Ala Thr Val Ser Arg Ile His Lys Val Glu Glu			
420	425	430	
gat tgt gat aaa atg aag cag ctc aag aaa aag gct gaa gca gca gat 1344			
Asp Cys Asp Lys Met Lys Gln Leu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Ala Asp			
435	440	445	
gtt gca aag tca cag ttc ctt gcc act gtt tca cat gaa atc aga act 1392			
Val Ala Lys Ser Gln Phe Leu Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr			
450	455	460	
cca atg aat ggt gtt cta gga atg ttg cat atg ctt atg gac aca gag 1440			
Pro Met Asn Gly Val Leu Gly Met Leu His Met Leu Met Asp Thr Glu			
465	470	475	480

tta gat gtt acg caa cag gat tat gtt agg acc gca cag gca agt gga 1488

Leu Asp Val Thr Gln Gln Asp Tyr Val Arg Thr Ala Gln Ala Ser Gly

485

490

495

aaa gct tta gtc tcg cta ata aat gag gtt ttg gac caa gca aag att 1536

Lys Ala Leu Val Ser Leu Ile Asn Glu Val Leu Asp Gln Ala Lys Ile

500

505

510

gaa tct gga aag ctt gaa ctt gag gag gtg cgg ttt gat ttg aga gga 1584

Glu Ser Gly Lys Leu Glu Leu Glu Glu Val Arg Phe Asp Leu Arg Gly

515

520

525

ata tta gat gat gtc ctg tca ctc ttc tct agc aag tcc caa caa aag 1632

Ile Leu Asp Asp Val Leu Ser Leu Phe Ser Ser Lys Ser Gln Gln Lys

530

535

540

ggg gtg gag ttg gca gta tac ata tct gat cgt gtt cca gat atg tta 1680

Gly Val Glu Leu Ala Val Tyr Ile Ser Asp Arg Val Pro Asp Met Leu

545

550

555

560

att ggt gat cct ggg agg ttt cga caa ata ctc aca aat ctt atg ggt 1728

Ile Gly Asp Pro Gly Arg Phe Arg Gln Ile Leu Thr Asn Leu Met Gly

565

570

575

aat tcc att aag ttc act gag aaa gga cac atc ttt gta act gtt cat 1776

Asn Ser Ile Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Thr Val His

580

585

590

ttg gtg gat gag cta ttt gaa tct atc gat gga gag aca gca tca tct 1824  
 Leu Val Asp Glu Leu Phe Glu Ser Ile Asp Gly Glu Thr Ala Ser Ser  
 595 600 605

ccg gaa agt aca ctg agt ggg ctt cca gtt gca gac cgg cag agg agc 1872  
 Pro Glu Ser Thr Leu Ser Gly Leu Pro Val Ala Asp Arg Gln Arg Ser  
 610 615 620

tgg gaa aac ttt aaa gct ttc agc tcc aac ggg cat cgg agc ttt gaa 1920  
 Trp Glu Asn Phe Lys Ala Phe Ser Ser Asn Gly His Arg Ser Phe Glu  
 625 630 635 640

cca tct ccc cct gat ata aac cta atc gtc tca gtt gag gat act ggc 1968  
 Pro Ser Pro Pro Asp Ile Asn Leu Ile Val Ser Val Glu Asp Thr Gly  
 645 650 655

gta ggg atc cct gta gaa gcg cag tcc cgt att ttt acg cct ttc atg 2016  
 Val Gly Ile Pro Val Glu Ala Gln Ser Arg Ile Phe Thr Pro Phe Met  
 660 665 670

caa gtc gga cca tcc ata tcc agg acg cat gga ggc aca gga att gga 2064  
 Gln Val Gly Pro Ser Ile Ser Arg Thr His Gly Gly Thr Gly Ile Gly  
 675 680 685

ctt agc ata agc aaa tgt cta gtt gga ctg atg aag gga gaa att gga 2112  
 Leu Ser Ile Ser Lys Cys Leu Val Gly Leu Met Lys Gly Glu Ile Gly  
 690 695 700

ttc tcg agt act ccc aag gtt ggg tcc aca ttc aca ttt act gct gta 2160

Phe Ser Ser Thr Pro Lys Val Gly Ser Thr Phe Thr Phe Thr Ala Val  
705 710 715 720

ttt tcc aat ggg atg caa cca gct gaa aga aag aat gac aac aac cag 2208  
Phe Ser Asn Gly Met Gln Pro Ala Glu Arg Lys Asn Asp Asn Asn Gln  
725 730 735

ccc ata ttc tcg gaa ttc cgg ggc atg aaa gct gtg gtt gtg gac cat 2256  
Pro Ile Phe Ser Glu Phe Arg Gly Met Lys Ala Val Val Val Asp His  
740 745 750

agg cct gca agg gca aaa gtc tcg tgg tac cat ttt cag cgt ctt gga 2304  
Arg Pro Ala Arg Ala Lys Val Ser Trp Tyr His Phe Gln Arg Leu Gly  
755 760 765

att cga gtc gaa gta gtt cca cgt gtt gaa cag gct cta cat tat ctg 2352  
Ile Arg Val Glu Val Val Pro Arg Val Glu Gln Ala Leu His Tyr Leu  
770 775 780

aag att ggt act acc act gtg aat atg ata ctc ata gag caa gaa ata 2400  
Lys Ile Gly Thr Thr Thr Val Asn Met Ile Leu Ile Glu Gln Glu Ile  
785 790 795 800

tgg aat agg gaa gca gat gat ttc att aaa aag cta cag aaa gac cct 2448  
Trp Asn Arg Glu Ala Asp Asp Phe Ile Lys Lys Leu Gln Lys Asp Pro  
805 810 815

ctt ttc ctt tct cct aag ttg att ttg tta gca aac tca gta gaa tcg 2496  
Leu Phe Leu Ser Pro Lys Leu Ile Leu Leu Ala Asn Ser Val Glu Ser

820	825	830	
tca ata tca gag gct tta tgc acc ggt ata gat cct cca ata gtg ata			2544
Ser Ile Ser Glu Ala Leu Cys Thr Gly Ile Asp Pro Pro Ile Val Ile			
835	840	845	
gtg aaa cca ttg agg gcg agt atg cta gca gca act ttg cag agg gga			2592
Val Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Leu Ala Ala Thr Leu Gln Arg Gly			
850	855	860	
ttg ggt att gga atc aga gaa cca cct caa cac aag gga cct cct gct			2640
Leu Gly Ile Gly Ile Arg Glu Pro Pro Gln His Lys Gly Pro Pro Ala			
865	870	875	880
ttg att ctc agg aat ctt ctc ctt ggt aga aaa att tta atc gtg gat			2688
Leu Ile Leu Arg Asn Leu Leu Leu Gly Arg Lys Ile Leu Ile Val Asp			
885	890	895	
gat aac aac gta aac ctc aga gtg gca gcg gga gct ctg aaa aag tac			2736
Asp Asn Asn Val Asn Leu Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Tyr			
900	905	910	
gga gct gat gtg gtc tgc gct gag agt ggg ata aag gca atc tca ttg			2784
Gly Ala Asp Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Ile Lys Ala Ile Ser Leu			
915	920	925	
ctt aag cca cct cac gag ttt gat gct tgc ttc atg gac att cag atg			2832
Leu Lys Pro Pro His Glu Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met			
930	935	940	

cca gaa atg gat gga ttt gaa gct aca agg aga ata cga gat atg gaa 2880  
 Pro Glu Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Arg Ile Arg Asp Met Glu  
 945 950 955 960

gag gag atg aac aag aga ata aag aat ggg gag gct ttg ata gta gag 2928  
 Glu Glu Met Asn Lys Arg Ile Lys Asn Gly Glu Ala Leu Ile Val Glu  
 965 970 975

aac ggt aac aaa aca agc tgg cat ctt ccg gta tta gca atg acg gca 2976  
 Asn Gly Asn Lys Thr Ser Trp His Leu Pro Val Leu Ala Met Thr Ala  
 980 985 990

gat gtg atc caa gca acg cat gag gaa tgt ctg aag tgt gga atg gat 3024  
 Asp Val Ile Gln Ala Thr His Glu Glu Cys Leu Lys Cys Gly Met Asp  
 995 1000 1005

ggg tat gta tca aaa cca ttt gaa gca gag cag ctg tac agg gaa gtt 3072  
 Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Ala Glu Gln Leu Tyr Arg Glu Val  
 1010 1015 1020

tct cgc ttt ttc aat tcg cct tca gat aca gaa tca taa 3111  
 Ser Arg Phe Phe Asn Ser Pro Ser Asp Thr Glu Ser  
 1025 1030 1035

<210> 4

<211> 1036

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

Met	Ser	Leu	Phe	His	Val	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Lys	Ile	Gly	His	Leu
1				5					10					15	
Phe	Trp	Met	Leu	Cys	Cys	Trp	Phe	Val	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asn	Gly
			20					25					30		
Ile	Glu	Asp	Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Ser	Val	Gly	Asp	Leu	Glu
		35					40						45		
Lys	Thr	Lys	Met	Thr	Thr	Leu	Lys	Lys	Lys	Asn	Lys	Met	Trp	Phe	Trp
	50					55						60			
Asn	Lys	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Lys	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Tyr	Gln
65				70					75					80	
Phe	Leu	Gly	Ser	Val	Lys	Phe	Asn	Lys	Ala	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Val
				85					90					95	
Val	Val	Trp	Val	Val	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Ser	Ile	Trp	Thr	Phe	Trp
			100					105						110	
Tyr	Phe	Ser	Ser	Gln	Ala	Met	Glu	Lys	Arg	Lys	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser
		115				120						125			
Met	Cys	Asp	Glu	Arg	Ala	Arg	Met	Leu	Gln	Asp	Gln	Phe	Asn	Val	Ser
		130				135						140			
Met	Asn	His	Val	Gln	Ala	Met	Ser	Ile	Leu	Ile	Ser	Thr	Phe	His	His
145				150					155					160	
Gly	Lys	Ile	Pro	Ser	Ala	Ile	Asp	Gln	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Tyr	Thr
				165					170					175	
Asp	Arg	Thr	Ser	Phe	Glu	Arg	Pro	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Ala	Tyr	Ala
			180					185					190		
Met	Arg	Val	Leu	His	Ser	Glu	Arg	Glu	Glu	Phe	Glu	Arg	Gln	Gln	Gly
		195					200						205		



Trp Thr Ile Arg Lys Met Tyr Ser Leu Glu Gln Asn Pro Val His Lys  
 210 215 220  
 Asp Asp Tyr Asp Leu Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Val Gln Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Tyr Ala Pro Val Ile Phe Ala Gln Asp Thr Val Ser His Val Val Ser  
 245 250 255  
 Leu Asp Met Leu Ser Gly Lys Glu Asp Arg Glu Asn Val Leu Arg Ala  
 260 265 270  
 Arg Ser Ser Gly Lys Gly Val Leu Thr Ala Pro Phe Pro Leu Ile Lys  
 275 280 285  
 Thr Asn Arg Leu Gly Val Ile Leu Thr Phe Ala Val Tyr Lys Arg Asp  
 290 295 300  
 Leu Pro Ser Asn Ala Thr Pro Lys Glu Arg Ile Glu Ala Thr Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Tyr Leu Gly Gly Val Phe Asp Ile Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu  
 325 330 335  
 Gln Gln Leu Ala Ser Lys Gln Thr Ile Leu Val Asn Val Tyr Asp Ile  
 340 345 350  
 Thr Asn His Ser Gln Pro Ile Ser Met Tyr Gly Thr Asn Val Ser Ala  
 355 360 365  
 Asp Gly Leu Glu Arg Val Ser Pro Leu Ile Phe Gly Asp Pro Leu Arg  
 370 375 380  
 Lys His Glu Met Arg Cys Arg Phe Lys Gln Lys Pro Pro Trp Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Gly Ile Leu Val Ile Ala Leu Leu Val  
 405 410 415  
 Ala His Ile Ile His Ala Thr Val Ser Arg Ile His Lys Val Glu Glu  
 420 425 430  
 Asp Cys Asp Lys Met Lys Gln Leu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Ala Asp

435	440	445
Val Ala Lys Ser Gln Phe Leu	Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr	
450	455	460
Pro Met Asn Gly Val Leu Gly Met Leu His Met Leu Met Asp Thr Glu		
465	470	475
Leu Asp Val Thr Gln Gln Asp Tyr Val Arg Thr Ala Gln Ala Ser Gly		480
	485	490
Lys Ala Leu Val Ser Leu Ile Asn Glu Val Leu Asp Gln Ala Lys Ile		495
500	505	510
Glu Ser Gly Lys Leu Glu Leu Glu Glu Val Arg Phe Asp Leu Arg Gly		
515	520	525
Ile Leu Asp Asp Val Leu Ser Leu Phe Ser Ser Lys Ser Gln Gln Lys		
530	535	540
Gly Val Glu Leu Ala Val Tyr Ile Ser Asp Arg Val Pro Asp Met Leu		
545	550	555
Ile Gly Asp Pro Gly Arg Phe Arg Gln Ile Leu Thr Asn Leu Met Gly		
	565	570
Asn Ser Ile Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Thr Val His		575
580	585	590
Leu Val Asp Glu Leu Phe Glu Ser Ile Asp Gly Glu Thr Ala Ser Ser		
595	600	605
Pro Glu Ser Thr Leu Ser Gly Leu Pro Val Ala Asp Arg Gln Arg Ser		
610	615	620
Trp Glu Asn Phe Lys Ala Phe Ser Ser Asn Gly His Arg Ser Phe Glu		
625	630	635
Pro Ser Pro Pro Asp Ile Asn Leu Ile Val Ser Val Glu Asp Thr Gly		640
	645	650
Val Gly Ile Pro Val Glu Ala Gln Ser Arg Ile Phe Thr Pro Phe Met		655
660	665	670

Gln Val Gly Pro Ser Ile Ser Arg Thr His Gly Gly Thr Gly Ile Gly  
675 680 685

Leu Ser Ile Ser Lys Cys Leu Val Gly Leu Met Lys Gly Glu Ile Gly  
690 695 700

Phe Ser Ser Thr Pro Lys Val Gly Ser Thr Phe Thr Phe Thr Ala Val  
705 710 715 720

Phe Ser Asn Gly Met Gln Pro Ala Glu Arg Lys Asn Asp Asn Asn Gln  
725 730 735

Pro Ile Phe Ser Glu Phe Arg Gly Met Lys Ala Val Val Val Asp His  
740 745 750

Arg Pro Ala Arg Ala Lys Val Ser Trp Tyr His Phe Gln Arg Leu Gly  
755 760 765

Ile Arg Val Glu Val Val Pro Arg Val Glu Gln Ala Leu His Tyr Leu  
770 775 780

Lys Ile Gly Thr Thr Thr Val Asn Met Ile Leu Ile Glu Gln Glu Ile  
785 790 795 800

Trp Asn Arg Glu Ala Asp Asp Phe Ile Lys Lys Leu Gln Lys Asp Pro  
805 810 815

Leu Phe Leu Ser Pro Lys Leu Ile Leu Leu Ala Asn Ser Val Glu Ser  
820 825 830

Ser Ile Ser Glu Ala Leu Cys Thr Gly Ile Asp Pro Pro Ile Val Ile  
835 840 845

Val Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Leu Ala Ala Thr Leu Gln Arg Gly  
850 855 860

Leu Gly Ile Gly Ile Arg Glu Pro Pro Gln His Lys Gly Pro Pro Ala  
865 870 875 880

Leu Ile Leu Arg Asn Leu Leu Leu Gly Arg Lys Ile Leu Ile Val Asp  
885 890 895

Asp Asn Asn Val Asn Leu Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Tyr

900	905	910	
Gly Ala Asp Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Ile Lys Ala Ile Ser Leu			
915	920	925	
Leu Lys Pro Pro His Glu Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met			
930	935	940	
Pro Glu Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Arg Ile Arg Asp Met Glu			
945	950	955	960
Glu Glu Met Asn Lys Arg Ile Lys Asn Gly Glu Ala Leu Ile Val Glu			
965	970	975	
Asn Gly Asn Lys Thr Ser Trp His Leu Pro Val Leu Ala Met Thr Ala			
980	985	990	
Asp Val Ile Gln Ala Thr His Glu Glu Cys Leu Lys Cys Gly Met Asp			
995	1000	1005	
Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Ala Glu Gln Leu Tyr Arg Glu Val			
1010	1015	1020	
Ser Arg Phe Phe Asn Ser Pro Ser Asp Thr Glu Ser			
1025	1030	1035	

<210> 5

<211> 3174

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3174)

<400> 5

atg aac tgg gca ctc aac aat cat caa gaa gaa gaa gaa gag cca cga 48

Met Asn Trp Ala Leu Asn Asn His Gln Glu Glu Glu Glu Glu Pro Arg

1 5 10 15

aga att gaa att tct gat tcc gag tca cta gaa aac ttg aaa agc agc 96

Arg Ile Glu Ile Ser Asp Ser Glu Ser Leu Glu Asn Leu Lys Ser Ser

20 25 30

gat ttt tat caa ctg ggt ggt ggt ggt gct ctg aat tcg tca gaa aag 144

Asp Phe Tyr Gln Leu Gly Gly Gly Gly Ala Leu Asn Ser Ser Glu Lys

35 40 45

ccg aga aag atc gat ttt tgg cgt tcg ggg ttg atg ggt ttt gcg aag 192

Pro Arg Lys Ile Asp Phe Trp Arg Ser Gly Leu Met Gly Phe Ala Lys

50 55 60

atg cag cag cag caa cag ctt cag cat tca gtg gcg gtg aag atg aac 240

Met Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln His Ser Val Ala Val Lys Met Asn

65 70 75 80

aat aat aat aat aac gat cta atg ggt aat aaa aaa ggg tca act ttc 288

Asn Asn Asn Asn Asn Asp Leu Met Gly Asn Lys Lys Gly Ser Thr Phe

85 90 95

ata caa gaa cat cga gca ttg tta cca aaa gct ttg att ctg tgg atc 336

Ile Gln Glu His Arg Ala Leu Leu Pro Lys Ala Leu Ile Leu Trp Ile

100 105 110

atc att gtt ggg ttt ata agc agt ggg att tat cag tgg atg gat gat 384  
 Ile Ile Val Gly Phe Ile Ser Ser Gly Ile Tyr Gln Trp Met Asp Asp  
 115 120 125

gct aat aag att aga agg gaa gag gtt ttg gtc agc atg tgt gat caa 432  
 Ala Asn Lys Ile Arg Arg Glu Glu Val Leu Val Ser Met Cys Asp Gln  
 130 135 140

aga gct aga atg ttg cag gat caa ttt agt gtt agt gtt aat cat gtt 480  
 Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Ser Val Ser Val Asn His Val  
 145 150 155 160

cat gct ttg gct att ctc gtc tcc act ttt cat tac cac aag aac cct 528  
 His Ala Leu Ala Ile Leu Val Ser Thr Phe His Tyr His Lys Asn Pro  
 165 170 175

tct gca att gat cag gag aca ttt gcg gag tac acg gca aga aca gca 576  
 Ser Ala Ile Asp Gln Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Thr Ala Arg Thr Ala  
 180 185 190

ttt gag aga ccg ttg cta agt gga gtg gct tat gct gaa aaa gtt gtg 624  
 Phe Glu Arg Pro Leu Leu Ser Gly Val Ala Tyr Ala Glu Lys Val Val  
 195 200 205

aat ttt gag agg gag atg ttt gag cgg cag cac aat tgg gtt ata aag 672  
 Asn Phe Glu Arg Glu Met Phe Glu Arg Gln His Asn Trp Val Ile Lys  
 210 215 220

aca atg gat aga gga gag cct tca ccg gtt agg gat gag tat gct cct 720

Thr Met Asp Arg Gly Glu Pro Ser Pro Val Arg Asp Glu Tyr Ala Pro  
 225 230 235 240

gtt ata ttc tct caa gat agt gtc tct tac ctt gag tca ctc gat atg 768  
 Val Ile Phe Ser Gln Asp Ser Val Ser Tyr Leu Glu Ser Leu Asp Met  
 245 250 255

atg tca ggc gag gag gat cgt gag aat att ttg cga gct aga gaa acc 816  
 Met Ser Gly Glu Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Glu Thr  
 260 265 270

gga aaa gct gtc ttg act agc cct ttt agg ttg ttg gaa act cac cat 864  
 Gly Lys Ala Val Leu Thr Ser Pro Phe Arg Leu Leu Glu Thr His His  
 275 280 285

ctc gga gtt gtg ttg aca ttc cct gtc tac aag tct tct ctt cct gaa 912  
 Leu Gly Val Val Leu Thr Phe Pro Val Tyr Lys Ser Ser Leu Pro Glu  
 290 295 300

aat ccg act gtc gaa gag cgt att gca gcc act gca ggg tac ctt ggt 960  
 Asn Pro Thr Val Glu Glu Arg Ile Ala Ala Thr Ala Gly Tyr Leu Gly  
 305 310 315 320

ggt gcg ttt gat gtg gag tct cta gtc gag aat tta ctt ggt cag ctt 1008  
 Gly Ala Phe Asp Val Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu Gly Gln Leu  
 325 330 335

gct ggt aac caa gca ata gtt gtg cat gtg tat gat atc acc aat gca 1056  
 Ala Gly Asn Gln Ala Ile Val Val His Val Tyr Asp Ile Thr Asn Ala



340	345	350	
tca gat cca ctt gtc atg tat ggt aat caa gat gaa gaa gcc gac aga			1104
Ser Asp Pro Leu Val Met Tyr Gly Asn Gln Asp Glu Glu Ala Asp Arg			
355	360	365	
tct ctc tct cat gag agc aag ctc gat ttt gga gac ccc ttc agg aaa			1152
Ser Leu Ser His Glu Ser Lys Leu Asp Phe Gly Asp Pro Phe Arg Lys			
370	375	380	
cat aag atg ata tgc agg tac cac caa aag gca cca ata cca ttg aat			1200
His Lys Met Ile Cys Arg Tyr His Gln Lys Ala Pro Ile Pro Leu Asn			
385	390	395	400
gtg ctc aca act gtg cca ttg ttc ttt gcg att ggt ttc ttg gtg ggt			1248
Val Leu Thr Thr Val Pro Leu Phe Phe Ala Ile Gly Phe Leu Val Gly			
405	410	415	
tat ata ctg tat ggt gca gct atg cac ata gta aaa gtc gaa gat gat			1296
Tyr Ile Leu Tyr Gly Ala Ala Met His Ile Val Lys Val Glu Asp Asp			
420	425	430	
ttc cat gaa atg caa gag ctt aaa gtg cga gca gaa gct gct gat gtc			1344
Phe His Glu Met Gln Glu Leu Lys Val Arg Ala Glu Ala Ala Asp Val			
435	440	445	
gct aaa tcg cag ttt ctt gct acc gtg tct cac gag atc agg aca cca			1392
Ala Lys Ser Gln Phe Leu Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr Pro			
450	455	460	

atg aat ggc att ctc gga atg ctt gct atg ctc cta gat aca gaa cta 1440  
Met Asn Gly Ile Leu Gly Met Leu Ala Met Leu Leu Asp Thr Glu Leu  
465 470 475 480

agc tcg aca cag aga gat tac gct caa acc gct caa gta tgt ggt aaa 1488  
Ser Ser Thr Gln Arg Asp Tyr Ala Gln Thr Ala Gln Val Cys Gly Lys  
485 490 495

gct ttg att gca ttg ata aat gag gtt ctt gat cgc gcc aag att gaa 1536  
Ala Leu Ile Ala Leu Ile Asn Glu Val Leu Asp Arg Ala Lys Ile Glu  
500 505 510

gct gga aag ctg gag ttg gaa tca gta cca ttt gat atc cgt tca ata 1584  
Ala Gly Lys Leu Glu Leu Glu Ser Val Pro Phe Asp Ile Arg Ser Ile  
515 520 525

ttg gat gat gtc ctt tct cta ttc tct gag gag tca agg aac aaa ggc 1632  
Leu Asp Asp Val Leu Ser Leu Phe Ser Glu Glu Ser Arg Asn Lys Gly  
530 535 540

att gag ctc gcg gtt ttc gtt tca gac aaa gta cca gag ata gtc aaa 1680  
Ile Glu Leu Ala Val Phe Val Ser Asp Lys Val Pro Glu Ile Val Lys  
545 550 555 560

gga gat tca ggg aga ttt aga cag ata atc ata aac ctt gtt gga aat 1728  
Gly Asp Ser Gly Arg Phe Arg Gln Ile Ile Ile Asn Leu Val Gly Asn  
565 570 575

tcg gtt aaa ttc aca gag aaa gga cat atc ttt gtt aaa gtc cat ctt 1776

Ser Val Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Lys Val His Leu

580

585

590

gcg gaa caa tca aaa gat gaa tct gaa ccg aaa aat gca ttg aat ggt 1824

Ala Glu Gln Ser Lys Asp Glu Ser Glu Pro Lys Asn Ala Leu Asn Gly

595

600

605

gga gtg tct gaa gaa atg atc gtt gtt tcc aaa cag tca agt tac aac 1872

Gly Val Ser Glu Glu Met Ile Val Val Ser Lys Gln Ser Ser Tyr Asn

610

615

620

aca ttg agc ggt tac gaa gct gct gat ggt cgg aat agc tgg gat tca 1920

Thr Leu Ser Gly Tyr Glu Ala Ala Asp Gly Arg Asn Ser Trp Asp Ser

625

630

635

640

ttc aag cat ttg gtc tct gag gag cag tca tta tcg gag ttt gat att 1968

Phe Lys His Leu Val Ser Glu Glu Gln Ser Leu Ser Glu Phe Asp Ile

645

650

655

tct agc aat gtt agg ctt atg gtt tca atc gaa gac acg ggt att gga 2016

Ser Ser Asn Val Arg Leu Met Val Ser Ile Glu Asp Thr Gly Ile Gly

660

665

670

atc cct tta gtt gca caa ggc cgt gtg ttt atg ccg ttt atg caa gca 2064

Ile Pro Leu Val Ala Gln Gly Arg Val Phe Met Pro Phe Met Gln Ala

675

680

685

gat agc tcg act tca aga aac tat gga ggt act ggt att ggt ttg agt 2112

Asp Ser Ser Thr Ser Arg Asn Tyr Gly Gly Thr Gly Ile Gly Leu Ser	
690	695 700
ata agc aag tgt ctt gtt gaa ctt atg cgt ggt cag ata aat ttc ata	2160
Ile Ser Lys Cys Leu Val Glu Leu Met Arg Gly Gln Ile Asn Phe Ile	
705	710 715 720
agc cgg cct cat att gga agc acg ttc tgg ttc acg gct gtt tta gag	2208
Ser Arg Pro His Ile Gly Ser Thr Phe Trp Phe Thr Ala Val Leu Glu	
725	730 735
aaa tgc gat aaa tgc agt gcg att aac cat atg aag aaa cct aat gtg	2256
Lys Cys Asp Lys Cys Ser Ala Ile Asn His Met Lys Lys Pro Asn Val	
740	745 750
gaa cac ttg cct tct act ttt aaa gga atg aaa gct ata gtt gtt gat	2304
Glu His Leu Pro Ser Thr Phe Lys Gly Met Lys Ala Ile Val Val Asp	
755	760 765
gct aag cct gtt aga gct gct gtg act aga tac cat atg aaa aga ctc	2352
Ala Lys Pro Val Arg Ala Ala Val Thr Arg Tyr His Met Lys Arg Leu	
770	775 780
gga atc aat gtt gat gtc gtg aca agt ctc aaa acc gct gtt gtt gca	2400
Gly Ile Asn Val Asp Val Val Thr Ser Leu Lys Thr Ala Val Val Ala	
785	790 795 800
gct gct gcg ttt gaa aga aac ggt tct cct ctc cca aca aaa ccg caa	2448
Ala Ala Ala Phe Glu Arg Asn Gly Ser Pro Leu Pro Thr Lys Pro Gln	

805	810	815	
ctt gat atg atc tta gta gag aaa gat tca tgg att tca act gaa gat			2496
Leu Asp Met Ile Leu Val Glu Lys Asp Ser Trp Ile Ser Thr Glu Asp			
820	825	830	
aat gac tca gag att cgt tta ttg aat tca aga acc aac gga aac gtt			2544
Asn Asp Ser Glu Ile Arg Leu Leu Asn Ser Arg Thr Asn Gly Asn Val			
835	840	845	
cat cac aag tct ccg aaa cta gct cta ttc gca aca aac atc aca aat			2592
His His Lys Ser Pro Lys Leu Ala Leu Phe Ala Thr Asn Ile Thr Asn			
850	855	860	
tcg gag ttc gac aga gct aaa tcc gca gga ttt gca gat acg gta ata			2640
Ser Glu Phe Asp Arg Ala Lys Ser Ala Gly Phe Ala Asp Thr Val Ile			
865	870	875	880
atg aaa ccg tta aga gca agc atg att ggg gcg tgt ctg caa caa gtt			2688
Met Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Ile Gly Ala Cys Leu Gln Gln Val			
885	890	895	
ctc gag ctg aga aaa aca aga caa caa cat cca gaa gga tca tca ccc			2736
Leu Glu Leu Arg Lys Thr Arg Gln Gln His Pro Glu Gly Ser Ser Pro			
900	905	910	
gca act ctc aag agc ttg ctt aca ggg aag aag att ctt gtg gtt gat			2784
Ala Thr Leu Lys Ser Leu Leu Thr Gly Lys Lys Ile Leu Val Val Asp			
915	920	925	

gat aat ata gtt aac agg aga gta gct gca gga gct ctc aag aaa ttt 2832

Asp Asn Ile Val Asn Arg Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Phe

930

935

940

gga gca gaa gtg gtt tgt gca gag agt ggt caa gtt gct ttg ggt ttg 2880

Gly Ala Glu Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Gln Val Ala Leu Gly Leu

945

950

955

960

ctt cag att cca cac act ttc gat gct tgc ttc atg gat att caa atg 2928

Leu Gln Ile Pro His Thr Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met

965

970

975

cca cag atg gac gga ttt gaa gca act cgt cag ata aga atg atg gag 2976

Pro Gln Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Gln Ile Arg Met Met Glu

980

985

990

aag gaa gct aaa gag aag acg aat ctc gaa tgg cat tta ccg att cta 3024

Lys Glu Ala Lys Glu Lys Thr Asn Leu Glu Trp His Leu Pro Ile Leu

995

1000

1005

gcg atg act gcg gat gtg ata cac gcg acc tac gag gaa tgt ctg aaa 3072

Ala Met Thr Ala Asp Val Ile His Ala Thr Tyr Glu Glu Cys Leu Lys

1010

1015

1020

agt ggg atg gat ggt tac gtc tcc aaa cct ttt gaa gaa gag aat ctc 3120

Ser Gly Met Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Asn Leu

1025

1030

1035

1040

tat aaa tcc gtt gcc aaa tca ttc aaa cct aat cct atc tca cct tcg 3168

Tyr Lys Ser Val Ala Lys Ser Phe Lys Pro Asn Pro Ile Ser Pro Ser

1045

1050

1055

tcg taa

3174

Ser

<210> 6

<211> 1057

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Asn Trp Ala Leu Asn Asn His Gln Glu Glu Glu Glu Glu Pro Arg

1

5

10

15

Arg Ile Glu Ile Ser Asp Ser Glu Ser Leu Glu Asn Leu Lys Ser Ser

20

25

30

Asp Phe Tyr Gln Leu Gly Gly Gly Gly Ala Leu Asn Ser Ser Glu Lys

35

40

45

Pro Arg Lys Ile Asp Phe Trp Arg Ser Gly Leu Met Gly Phe Ala Lys

50

55

60

Met Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln His Ser Val Ala Val Lys Met Asn

65

70

75

80

Asn Asn Asn Asn Asn Asp Leu Met Gly Asn Lys Lys Gly Ser Thr Phe

85

90

95

Ile Gln Glu His Arg Ala Leu Leu Pro Lys Ala Leu Ile Leu Trp Ile

100

105

110

Ile Ile Val Gly Phe Ile Ser Ser Gly Ile Tyr Gln Trp Met Asp Asp



115	120	125
Ala Asn Lys Ile Arg Arg Glu Glu Val Leu Val Ser Met Cys Asp Gln		
130	135	140
Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Ser Val Ser Val Asn His Val		
145	150	155
His Ala Leu Ala Ile Leu Val Ser Thr Phe His Tyr His Lys Asn Pro		
165	170	175
Ser Ala Ile Asp Gln Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Thr Ala Arg Thr Ala		
180	185	190
Phe Glu Arg Pro Leu Leu Ser Gly Val Ala Tyr Ala Glu Lys Val Val		
195	200	205
Asn Phe Glu Arg Glu Met Phe Glu Arg Gln His Asn Trp Val Ile Lys		
210	215	220
Thr Met Asp Arg Gly Glu Pro Ser Pro Val Arg Asp Glu Tyr Ala Pro		
225	230	235
Val Ile Phe Ser Gln Asp Ser Val Ser Tyr Leu Glu Ser Leu Asp Met		
245	250	255
Met Ser Gly Glu Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Glu Thr		
260	265	270
Gly Lys Ala Val Leu Thr Ser Pro Phe Arg Leu Leu Glu Thr His His		
275	280	285
Leu Gly Val Val Leu Thr Phe Pro Val Tyr Lys Ser Ser Leu Pro Glu		
290	295	300
Asn Pro Thr Val Glu Glu Arg Ile Ala Ala Thr Ala Gly Tyr Leu Gly		
305	310	315
Gly Ala Phe Asp Val Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu Gly Gln Leu		
325	330	335
Ala Gly Asn Gln Ala Ile Val Val His Val Tyr Asp Ile Thr Asn Ala		
340	345	350

Ser Asp Pro Leu Val Met Tyr Gly Asn Gln Asp Glu Glu Ala Asp Arg			
355	360	365	
Ser Leu Ser His Glu Ser Lys Leu Asp Phe Gly Asp Pro Phe Arg Lys			
370	375	380	
His Lys Met Ile Cys Arg Tyr His Gln Lys Ala Pro Ile Pro Leu Asn			
385	390	395	400
Val Leu Thr Thr Val Pro Leu Phe Phe Ala Ile Gly Phe Leu Val Gly			
	405	410	415
Tyr Ile Leu Tyr Gly Ala Ala Met His Ile Val Lys Val Glu Asp Asp			
	420	425	430
Phe His Glu Met Gln Glu Leu Lys Val Arg Ala Glu Ala Ala Asp Val			
	435	440	445
Ala Lys Ser Gln Phe Leu Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr Pro			
	450	455	460
Met Asn Gly Ile Leu Gly Met Leu Ala Met Leu Leu Asp Thr Glu Leu			
465	470	475	480
Ser Ser Thr Gln Arg Asp Tyr Ala Gln Thr Ala Gln Val Cys Gly Lys			
	485	490	495
Ala Leu Ile Ala Leu Ile Asn Glu Val Leu Asp Arg Ala Lys Ile Glu			
	500	505	510
Ala Gly Lys Leu Glu Leu Glu Ser Val Pro Phe Asp Ile Arg Ser Ile			
	515	520	525
Leu Asp Asp Val Leu Ser Leu Phe Ser Glu Glu Ser Arg Asn Lys Gly			
	530	535	540
Ile Glu Leu Ala Val Phe Val Ser Asp Lys Val Pro Glu Ile Val Lys			
545	550	555	560
Gly Asp Ser Gly Arg Phe Arg Gln Ile Ile Ile Asn Leu Val Gly Asn			
	565	570	575
Ser Val Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Lys Val His Leu			

580	585	590
Ala Glu Gln Ser Lys Asp Glu Ser Glu Pro Lys Asn Ala Leu Asn Gly		
595	600	605
Gly Val Ser Glu Glu Met Ile Val Val Ser Lys Gln Ser Ser Tyr Asn		
610	615	620
Thr Leu Ser Gly Tyr Glu Ala Ala Asp Gly Arg Asn Ser Trp Asp Ser		
625	630	635
Phe Lys His Leu Val Ser Glu Glu Gln Ser Leu Ser Glu Phe Asp Ile		
645	650	655
Ser Ser Asn Val Arg Leu Met Val Ser Ile Glu Asp Thr Gly Ile Gly		
660	665	670
Ile Pro Leu Val Ala Gln Gly Arg Val Phe Met Pro Phe Met Gln Ala		
675	680	685
Asp Ser Ser Thr Ser Arg Asn Tyr Gly Gly Thr Gly Ile Gly Leu Ser		
690	695	700
Ile Ser Lys Cys Leu Val Glu Leu Met Arg Gly Gln Ile Asn Phe Ile		
705	710	715
Ser Arg Pro His Ile Gly Ser Thr Phe Trp Phe Thr Ala Val Leu Glu		
725	730	735
Lys Cys Asp Lys Cys Ser Ala Ile Asn His Met Lys Lys Pro Asn Val		
740	745	750
Glu His Leu Pro Ser Thr Phe Lys Gly Met Lys Ala Ile Val Val Asp		
755	760	765
Ala Lys Pro Val Arg Ala Ala Val Thr Arg Tyr His Met Lys Arg Leu		
770	775	780
Gly Ile Asn Val Asp Val Val Thr Ser Leu Lys Thr Ala Val Val Ala		
785	790	795
Ala Ala Ala Phe Glu Arg Asn Gly Ser Pro Leu Pro Thr Lys Pro Gln		
805	810	815

Leu Asp Met Ile Leu Val Glu Lys Asp Ser Trp Ile Ser Thr Glu Asp  
 820 825 830  
 Asn Asp Ser Glu Ile Arg Leu Leu Asn Ser Arg Thr Asn Gly Asn Val  
 835 840 845  
 His His Lys Ser Pro Lys Leu Ala Leu Phe Ala Thr Asn Ile Thr Asn  
 850 855 860  
 Ser Glu Phe Asp Arg Ala Lys Ser Ala Gly Phe Ala Asp Thr Val Ile  
 865 870 875 880  
 Met Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Ile Gly Ala Cys Leu Gln Gln Val  
 885 890 895  
 Leu Glu Leu Arg Lys Thr Arg Gln Gln His Pro Glu Gly Ser Ser Pro  
 900 905 910  
 Ala Thr Leu Lys Ser Leu Leu Thr Gly Lys Lys Ile Leu Val Val Asp  
 915 920 925  
 Asp Asn Ile Val Asn Arg Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Phe  
 930 935 940  
 Gly Ala Glu Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Gln Val Ala Leu Gly Leu  
 945 950 955 960  
 Leu Gln Ile Pro His Thr Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met  
 965 970 975  
 Pro Gln Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Gln Ile Arg Met Met Glu  
 980 985 990  
 Lys Glu Ala Lys Glu Lys Thr Asn Leu Glu Trp His Leu Pro Ile Leu  
 995 1000 1005  
 Ala Met Thr Ala Asp Val Ile His Ala Thr Tyr Glu Glu Cys Leu Lys  
 1010 1015 1020  
 Ser Gly Met Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Asn Leu  
 1025 1030 1035 1040  
 Tyr Lys Ser Val Ala Lys Ser Phe Lys Pro Asn Pro Ile Ser Pro Ser

1045

1050

1055

Ser

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

Glu Thr Ser Val Lys Ile Leu Val Val Glu Asp Asn His Val Asn Gln

1

5

10

15

Glu Val Ile Lys Arg Met Leu Asn Leu Glu Gly Ile Glu Asn Ile Glu

20

25

30

Leu Ala Cys Asp Gly Gln Glu Ala Phe Asp Lys Val Lys Glu Leu Thr

35

40

45

Ser Lys Gly Glu Asn Tyr Asn Met Ile Phe Met Asp Val Gln Met Pro

50

55

60

Lys Val Asp Gly Leu Leu Ser Thr Lys Met Ile Arg Arg Asp Leu Gly

65

70

75

80

Tyr Thr Ser Pro Ile Val Ala Leu Thr Ala Phe Ala Asp Asp Ser Asn

85

90

95

Ile Lys Glu Cys Leu Glu Ser Gly Met Asn Gly Phe Leu Ser Lys Pro

100

105

110

Ile Lys Arg Pro Lys Leu Lys Thr Ile Leu Thr Glu Phe

115

120

125

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Asn Asp Asp Met Met Ile Leu Val Val Asp Asp His Pro Ile Asn Arg

1

5

10

15

Arg Leu Leu Ala Asp Gln Leu Gly Ser Leu Gly Tyr Gln Cys Lys Thr

20

25

30

Ala Asn Asp Gly Val Asp Ala Leu Asn Val Leu Ser Lys Asn His Ile

35

40

45

Asp Ile Val Leu Ser Asp Val Asn Met Pro Asn Met Asp Gly Tyr Arg

50

55

60

Leu Thr Gln Arg Ile Arg Gln Leu Gly Leu Thr Leu Pro Val Ile Gly

65

70

75

80

Val Thr Ala Asn Ala Leu Ala Glu Glu Lys Gln Arg Cys Leu Glu Ser

85

90

95

Gly Met Asp Ser Cys Leu Ser Lys Pro Val Thr Leu Asp Val Ile Lys

100

105

110

Gln Ser Leu Thr Leu Tyr

115

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

tccccgcgga aaatgttctt acggttaggt ag

32

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

oligonucleotide primer for PCR

<400> 10

tcggtcgact tatgattctg tatctgaagg cga

33

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

tcagatatga actgggcact caac

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 12



ctcaatgctt ttgttccttg actc

24

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 13

accatgaact gggcactcaa caatcatcaa g

31

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 14

ggattacgac gaaggtgaga taggattagg

30

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 15

gatcccagct agctagggcc ctaccgcggg ga

32

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 16

tccccgcgga aaatgttctt acggttaggt ag

32

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 17

tcggtcgact tatgattctg tatctgaagg cga

33

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 18

ctagtccccg cggtagggcc ctagctagct gg

32

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 19

tccccgcgga aaatgtctat aacttgtag c

31

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 20

ctagctagct taacaaggtt caaagaatct tgc

33

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 21

tccccgcgga aaatgaaagc acgaggtgag agg

33

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 22

ctagctagct taacaagggtt caaagaattt gc

32

【書類名】                      要約書

【要約】

【課題】

鋭敏で、簡便、迅速な、サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用の測定方法やサイトカニン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】

特定のアミノ酸配列を有するサイトカニン受容体、該サイトカニン受容体の変異型サイトカニン受容体または該サイトカニン受容体に基づいて作製されたキメラ受容体をコードするDNAを宿主細胞に導入し発現させた形質転換細胞と被験物質とを接触させて、サイトカニン受容体に対する被験物質のアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用を測定する。また、この測定方法をによって、サイトカニン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする。

【選択図】                      なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
氏 名 住友化学工業株式会社